

Aus der
Klinik für Innere Medizin IV – Nieren- und Hochdruckkrankheiten
Universitätsklinikum des Saarlandes
Homburg/Saar
Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Danilo Fliser

**BEDINGT EIN HYPERPHOSPHATIONISMUS
DIE MONOZYTENDYSFUNKTION CHRONISCH
NIERENKRANKER MENSCHEN?**

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

vorgelegt von Aurelia Luthe
geboren am 04. Januar 1983 in Aachen

1. Inhalt

1.	Inhalt.....	3
2.	Zusammenfassung	6
3.	Summary	8
4.	Einleitung	10
4.1	Atherosklerose als chronisch inflammatorische Erkrankung	10
4.2	Heterogenität der humanen Monozyten	11
4.3	Das phosphaturische Hormon FGF23 als potentieller Immunmodulator.....	14
4.4	Zielsetzung.....	15
5.	Materialien	17
6.	Methoden.....	22
6.1	KLINISCHER STUDIENPART	22
6.1.1	HOM sweet HOMe Studie	22
6.1.2	Dialysestudie	23
6.2	EXPERIMENTELLER STUDIENPART	24
6.2.1	Durchflusszytometrie (FACS).....	24
6.2.2	Monozytenfärbung im Vollblut.....	27
6.2.3	Messung der Rezeptoren FGFR1, FGFR2, Klotho	28
6.2.4	Vollblutstimulation.....	28
6.2.5	Isolation von PBMCs	28
6.2.6	Isolation hämatopoetischer Stammzellen.....	29
6.2.7	Kultivierung und Expansion hämatopoetischer Stammzellen.....	30
6.2.8	Zellzählung.....	30
6.2.9	Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu Monozyten.....	31
6.2.10	Proliferationsassay	31
6.2.11	Messung der Phagozytoserate	32

6.2.12	Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies	33
6.3	STATISTIK	35
7.	Ergebnisse	36
7.1	KLINISCHER STUDIENPART	36
7.1.1	Beziehung zwischen Monozyten und FGF23 im nierengesunden Patientenkollektiv	36
7.1.2	Beziehung zwischen Monozyten zu FGF23 im nierenkranken Patientenkollektiv	41
7.2	EXPERIMENTELLER STUDIENPART	45
7.2.1	Verteilung der Monozytensubpopulationen bei Dialysepatienten und gesunden Probanden	45
7.2.2	Verteilung der FGF-Rezeptoren und Klotho auf den Monozytensubpopulationen	45
7.3	VERSUCHSREIHE VOLLBLUTSTIMULATION	48
7.3.1	Vollblutstimulation mit rekombinantem FGF23 aus HEK 293 Zellen	48
7.3.2	Vollblutstimulation mit LPS	49
7.3.3	Vollblutstimulation mit rekombinantem FGF23 aus NS0 Zellen	50
7.3.4	Analyse von Oberflächenrezeptoren nach FGF23 Stimulation.....	51
7.3.5	Phagozytosekapazität klassischer Monozyten	53
7.3.6	Induktion der T-Zellproliferation	53
7.3.7	ROS Bildung ausdifferenzierter Monozyten	54
7.4	VERSUCHSREIHE STAMMZELLVERSUCHE	55
7.4.1	Isolation von hämatopoetischen Stammzellen	55
7.4.2	Expansion hämatopoetischer Stammzellen	55
7.4.3	Expression von FGF Rezeptoren und Klotho auf der Oberfläche von hämatopoetischen Stammzellen	56
7.4.4	Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu Monozytensubpopulationen	57

7.4.5	Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu Monozyten unter FGF23 Stimulation	58
7.4.6	Expression von Oberflächenrezeptoren differenzierter Monozyten	58
7.4.7	Phagozytosekapazität differenzierter intermediärer Monozyten.....	60
7.4.8	ROS Produktion differenzierter Monozyten	60
8.	Diskussion	62
8.1	Urämischer Immundefekt	62
8.2	Monozytenheterogenität bei Urämie	63
8.3	FGF23 als Prädiktor intermediärer Monozyten.....	65
8.4	Experimentelle Untersuchungen zu FGF23 als Immunmodulator	66
8.5	FGF23 und Inflammation	69
8.6	Forschungsausblick	70
8.7	Therapieansätze	71
8.8	Schlussfolgerung	73
9.	Literaturverzeichnis.....	74
10.	Präsentationen	80
10.1	Stipendium	80
11.	Danksagung	81
12.	Anhang	82
12.1	Abkürzungsverzeichnis.....	82
12.2	Abbildungsverzeichnis.....	86
12.3	Tabellenverzeichnis	88
12.4	Fragebogen Dialysestudie	89

2. Zusammenfassung

Hintergrund

Monozyten sind zentrale Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie sind eine heterogene Zellpopulation, die sich anhand der Expression von CD14 und CD16 in drei Subpopulationen unterteilen lassen: klassische CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten, intermediäre CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten und nichtklassische CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten. In experimentellen und klinischen Arbeiten wurden die intermediären Monozyten als besonders proinflammatorische Mediatoren des angeborenen Immunsystems charakterisiert, welche neben ihrer eigentlichen Aufgabe in der Infektabwehr auch in unerwünschter Weise zur Entstehung chronisch-inflammatorischer Erkrankungen wie der Atherosklerose beitragen.

Im Rahmen der chronischen Nierenerkrankung kommt es zu einer monozytären Dysfunktion mit einem Anstieg der Zellzahlen der intermediären Monozyten, deren Genese noch unklar ist. Kürzlich wurde das phosphaturische Hormon FGF23, dessen Plasmaspiegel bei chronisch nierenkranken Menschen deutlich erhöht sind, als Modulator des Immunsystems diskutiert und bereits die Option therapeutischer Eingriffe in die FGF23 - Phosphat - Regelkreise mit dem Ziel einer Immunregulation postuliert. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Promotionsarbeit untersucht, ob FGF23 zur monozytären Dysfunktion und zum Anstieg der intermediären Monozyten bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung beiträgt.

Methoden

In epidemiologischen Untersuchungen wurde bei 951 nierengesunden Probanden sowie 46 chronisch nierenkranken Patienten der Zusammenhang zwischen FGF23 Plasmaspiegeln und Zellzahlen der Monozytensubpopulationen untersucht.

Anschließend wurden *in vitro* humane Monozyten mit aufsteigender Konzentration an rekombinantem FGF23 stimuliert und die Verteilung der Monozytensubpopulationen sowie die Bildung proatherogener Chemokinrezeptoren (CCR5, CX₃CR1) und reaktiver Sauerstoffspezies bestimmt. Funktionell wurde die Fähigkeit der Monozyten zur Phagozytose und zur Induktion der T-Zellproliferation untersucht. Schließlich wurden humane

hämatopoetische Stammzellen unter FGF23 Stimulation zu Monozytensubpopulationen differenziert.

Ergebnisse

Die epidemiologischen Untersuchungen ergaben im nierengesunden Patientenkollektiv einen signifikanten Zusammenhang zwischen Zellzahlen der intermediären Monozyten und Plasma FGF23. FGF23 blieb auch in einer multivariaten Regressionsanalyse nach Korrektur für die kardiovaskulären Risikofaktoren sowie die Nierenfunktion ein signifikanter Prädiktor der intermediären Monozytenzahlen. Allerdings konnte im deutlich kleineren nierenkranken Patientenkollektiv dieser Zusammenhang zwischen FGF23 und intermediären Monozyten nicht auf Signifikanzniveau bestätigt werden.

Eine Stimulation der Zellen mit rekombinantem FGF23 induzierte weder eine Verschiebung in der Verteilung der Monozytensubpopulationen noch eine Hochregulation von Chemokinrezeptoren, eine Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, eine Zunahme der Phagozytoserate oder eine verstärkte Induktion der T-Zell Proliferation. Die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu CD14++CD16+ Monozyten war unter FGF23 Stimulation tendenziell beschleunigt, jedoch ohne vordefinierte Grenzen der statistischen Signifikanz zu unterschreiten.

Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals untersucht, ob sich das phosphaturische Hormon FGF23 auf die Zellzahlen zirkulierender Monozytensubpopulationen auswirkt und ob es zur Monozytendysfunktion beiträgt. Klinisch-epidemiologische Untersuchungen der nierengesunden Kohorte zeigten, dass FGF23 mit der Anzahl der intermediären Monozyten korrelierte. Im Gegensatz dazu stehen die epidemiologischen Daten bei chronisch nierenkranken Menschen sowie die *in vitro* Daten, die keinen Zusammenhang zwischen FGF23 und der Verteilung oder der Funktion von Monozytensubpopulationen aufzeigen konnten. Obwohl Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen eine Wirkung von FGF23 auf Monozyten suggerieren, können die Daten der vorgelegten Promotionsarbeit eine direkte Wirkung des Hormons auf Monozyten nicht bestätigen. Therapeutische Eingriffe in FGF23 – Phosphat – Regelkreise mit dem Ziel einer Immunregulation erscheinen somit verfrüht.

3. Summary

DOES HYPERPHOSPHATONISM INDUCE MONOCYTE DYSFUNCTION IN PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE?

Background

Monocytes, central cellular components of the innate immune system, are a heterogeneous cell population. Their expression of CD14 and CD16 allows to subdivide monocytes into three subpopulations, namely classical CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes, intermediate CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes and non-classical CD14⁺CD16⁺⁺ monocytes. Both, *in vitro* experiments and clinical studies, characterised intermediate monocytes as pro-inflammatory cells, which may – beside their physiological tasks in the immune defence – contribute in an untoward manner to the development of chronic inflammatory diseases like atherosclerosis.

Chronic kidney disease is characterized by a state of monocyte dysfunction and a concomitant increase in cell counts of intermediate monocytes, the underlying mechanisms of which are still unknown. Recently, the phosphaturic hormone FGF23 was discussed as a modulator of the immune system. As patients with chronic kidney disease face a tremendous increase in plasma FGF23, therapeutical inventions into the FGF23-phosphate regulatory circuit were proposed with the goal of targeting uremic immune dysfunction.

Against this background, we aimed to test the hypothesis that FGF23 contributes to monocyte dysfunction and to the elevated cell counts of intermediate monocytes in patients with chronic kidney disease.

Methods

In epidemiological studies, we examined the association between plasma FGF23 and cell counts of monocyte subpopulations among 951 patients without overt chronic kidney disease, and among 46 patients on haemodialysis.

Next *in vitro* experiments were performed, in which human monocytes were stimulated with increasing concentrations of FGF23 for subsequent flow cytometrical analysis of the expression of pro-atherogenic chemokine receptors (CCR5, CX₃CR1) and production of reactive oxygen species (ROS). Furthermore, monocytic capacity to phagocyte and to induce

T-cell proliferation was measured after FGF23 stimulation. Finally, differentiation of monocyte subpopulations from CD34⁺ hematopoietic stem cells after FGF23 stimulation was flow-cytometrically analysed.

Results

In patients without overt chronic kidney disease, cell counts of intermediate monocytes and plasma FGF23 were significantly correlated. Plasma FGF23 remained a significant predictor of intermediate monocytes counts even after adjustment for cardiovascular risk factors and for kidney function in multivariate regression analysis. Of note, the association between FGF23 and intermediate monocyte counts did not reach statistical significance in the considerably smaller cohort of haemodialysis patients.

In vitro FGF23 stimulation neither affected the distribution of monocytes subpopulations nor the expression of chemokine receptors nor the production of reactive oxygen species. Moreover, FGF23 stimulation did not impair monocyte capacity to phagocyte or to induce T-cell proliferation. Finally, even though differentiation of proinflammatory CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes from CD34⁺ hematopoietic stem cells tended to be accelerated, pre-defined levels of statistical significance were not reached.

Conclusion

We explored for the first time the effect of the phosphatoretic hormone FGF23 on circulating monocyte subpopulations and its contribution to monocyte dysfunction. Epidemiologically, plasma FGF23 and cell counts of intermediate monocytes were significantly correlated among patients without overt chronic kidney disease. These results contrast with findings from haemodialysis patients and with *in vitro* data, which found no relevant effect of FGF23 on the distribution and function of monocyte subpopulations.

Thus our study cannot confirm results from other groups, which have postulated a significant immunologic role of FGF23.

In summary, the idea of therapeutic intervention in the FGF23-phosphate regulatory circuit with the aim to modify monocyte dysfunction in chronic kidney disease appears premature.

4. Einleitung

Aufgrund ihrer ansteigenden Prävalenz in westlichen Industrienationen gewinnt die chronische Nierenerkrankung („chronic kidney disease“; CKD) eine zunehmende gesundheitsökonomische Bedeutung [9]. So erbrachten große epidemiologische Untersuchungen in den Vereinigten Staaten eine Prävalenz der CKD von ~ 13 % in der erwachsenen Allgemeinbevölkerung [9].

Im Gegensatz zu anderen chronischen Erkrankungen sind CKD Patienten im Verlaufe ihrer Erkrankung zumeist über viele Jahre asymptomatisch. Erst im Terminalstadium treten typische Symptome der Urämie auf [48]. Trotzdem weisen Patienten bereits in frühen CKD Stadien, gegenüber nierengesunden Menschen, eine deutlich erhöhte extrarenale Morbidität und Mortalität auf, die während der Progression der CKD exponentiell ansteigen. Hauptursache ist ein deutlich erhöhtes Risiko, kardiovaskuläre Erkrankungen („cardiovascular disease“, CVD) zu erleiden [71], welches vor allem auf einer beschleunigten Atherosklerose dieser Patientenpopulation beruht [18]. Daneben spielen auch andere Faktoren wie linksventrikuläre Hypertrophie und Herzinsuffizienz, die in einer deutlich erhöhten Inzidenz maligner Arrhythmien münden, eine entscheidende Rolle für die hohe kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität dieser Patienten [29]. Die häufige Kombination von CVD und CKD wurde in einer Konsensuskonferenz als „kardiorenales Syndrom“ definiert [29, 61].

Das hohe kardiovaskuläre Risiko bei nierenkranken Patienten lässt sich nicht komplett durch die erhöhte Prävalenz klassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, arteriellen Hypertonus, Rauchen, Diabetes mellitus und höheren Alters erklären [72]. Daher liegt ein Fokus der heutigen nephrologischen Forschung auf nichttraditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren, wie der Inflammation, der Mangelernährung und dem oxidativen Stress [72].

4.1 Atherosklerose als chronisch inflammatorische Erkrankung

Das Verständnis der Pathogenese der Atherosklerose hat sich in den letzten Jahrzehnten deutlich verändert. Galt sie früher als ein rein passiver Speicherungsprozess von Lipiden, der sekundär eine Proliferation von ortständigen Gefäßzellen induziert [62], so wird die

Atherosklerose heute als aktive Gefäßerkrankung betrachtet, in der Immunzellen und deren Botenstoffe als bedeutende Mediatoren verstanden werden [25, 41].

Das aktuelle pathophysiologische Verständnis der Atherosklerose postuliert, dass eine initiale Endothelschädigung – etwa durch klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren – zu einer endothelialen Dysfunktion führt, woraufhin Endothelzellen vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimieren. Dieses erlaubt die Anlagerung von zirkulierenden Monozyten, die nachfolgend in die Intimaschicht der Gefäßwand einzuwandern vermögen, in welcher sie sich zu Makrophagen differenzieren und subendothelial oxidiertes Cholesterin aufnehmen, das zuvor durch die veränderte endotheliale Permeabilität in der Gefäßwand akkumulierte. Nach Aufnahme dieser Lipidpartikel differenzieren sich die Makrophagen zu Schaumzellen, die proinflammatorische Mediatoren wie Interleukin-1- β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor (TNF) bilden. Dadurch werden weitere zirkulierende Immunzellen angelockt, die die chronische Inflammation aufrecht erhalten. Zudem wandern glatte Muskelzellen in die Intima der Gefäße ein, in welcher sie der entstehenden Plaque durch die Produktion von Kollagen Stabilität verleihen. Jedoch bilden proinflammatorische Immunzellen Kollagenasen, welche Kollagen abzubauen vermögen, so dass Immunzellen schließlich auch die Plaqueruptur als zentrales klinisches Ereignis in der Arteriosklerose fördern [42].

4.2 Heterogenität der humanen Monozyten

Somit weist unser aktuelles pathophysiologisches Verständnis Monozyten eine essentielle Bedeutung in der Entstehung und Progredienz der Atherosklerose zu. Monozyten sind zentrale Komponenten des angeborenen Immunsystems, die durch ihre Eigenschaft als Phagozyten und nachfolgender Antigenpräsentation mit dem adaptiven Immunsystem interagieren. Sie entstehen aus myeloiden Vorläuferzellen, zirkulieren dann als Monozyten im Blut, bevor sie ins Gewebe wandern und sich zu Gewebsmakrophagen und Dendritischen Zellen differenzieren.

Phänotypisch und funktionell sind Monozyten eine heterogene Zellpopulation. Anhand ihrer differentiellen Expression des LPS Rezeptors CD14 und des Fc γ III Rezeptors CD16 wurden 1989 erstmals zwei unterschiedliche Subpopulationen unterschieden, die mittels Durchflusszytometrie differenziert werden können: Einerseits Monozyten mit alleiniger CD14 Expression (CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten), andererseits Monozyten mit Ko-Expression von CD14 und CD16 (CD16⁺ Monozyten) [54].

Die Zellzahl CD16 + Monozyten erhöht sich deutlich bei Inflammationserkrankungen [80] wie Sepsis, Tuberkulose, Asthma bronchiale, HIV Infektionen, bei onkologischen Erkrankungen [2], bei atherosklerotischen Erkrankungen wie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit [13] und der Koronaren Herzkrankheit [52] sowie bei chronischer Nierenerkrankungen [59]. Sie produzieren auch die höheren Level an den inflammatorischen Zytokinen TNF- α und IL-1 β nach LPS Stimulation [10, 79].

Nach dieser ersten Unterscheidung in CD14⁺⁺CD16⁻ und CD16⁺ Monozyten wurde erstmals 2003 eine weitere Unterteilung von CD16 + Monozyten in zwei phänotypisch und funktionell unterschiedliche Subpopulationen vorgeschlagen [2, 79].

In Folge kursierten mehrere Jahre lang viele, teilweise widersprüchliche Bezeichnungen für die unterschiedlichen Monozytensubpopulationen, welche aus der Verwendung unterschiedlicher Antikörper und diverser Gatingstrategien resultierten, bis 2010 eine Expertengruppe erstmals eine einheitliche Definition der Monozytensubpopulationen vorschlug [80].

Es wurden folgende Bezeichnungen für die Monozytensubpopulationen vorgeschlagen:

- Klassische CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten
- Intermediäre CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten
- Nichtklassische CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten

Wenn zwischen den intermediären und nicht-klassischen Monozyten nicht unterschieden wird, sollten sie gemeinsam als CD16 + Monozyten bezeichnet werden [80]. Genexpressionsanalysen konnten die Existenz von drei distinkten Monozytensubpopulationen bestätigen, da sich intermediäre Monozyten im Expressionsmuster sowohl von klassischen als auch von nicht-klassischen Monozyten unterscheiden [79].

Heutzutage geht man davon aus, dass Monozyten als CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten das Knochenmark verlassen und sich dann erst zu CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten und schließlich zu CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten entwickeln. Genauere Beweise für diese Annahme liegen bis dato jedoch nicht vor [79].

Funktionell weisen - neben der unterschiedlichen Produktion von proinflammatorischen Zytokinen - weitere Unterschiede auf distinkte Funktionen der einzelnen Monozytensubpopulationen hin. So zeigen die klassischen Monozyten die höchste

Phagozytoserate [79] und die höchste Produktion von antimikrobiellen Substanzen auf [79]. Zusätzlich exprimieren sie den Chemokinrezeptor 2 (CCR2), der durch Interaktion mit dem Chemokin monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) die Extraversion und transendotheliale Migration von klassischen Monozyten etwas in atherosklerotisches Gewebe vermittelt [76].

Intermediäre Monozyten sind im Vergleich zu den anderen beiden Subpopulation durch stärkere Produktion reaktiver Sauerstoffspezies [79] vermehrter Antigenpräsentation mittels MHCII Komplexen [63, 79] und T Zell-Stimulation charakterisiert [63]. Es wird vermutet, dass sie das breiteste Spektrum von Chemokinrezeptoren exprimieren, welches neben CCR2 und CX₃CR1 spezifisch den Chemokinrezeptor 5 (CCR5) umfasst, der durch Interaktion mit dem Chemokin Ligand 5 (CCL5) die transendotheliale Migration der intermediären Monozyten vermitteln kann [45].

Nicht-klassische Monozyten patrollieren das Endothel [10] und produzieren proinflammatorische Zytokine als Antwort auf Viruspartikel oder auf Immunkomplexe mit Nukleinsäuren durch die Toll-like Rezeptoren 7 und 8 (TLR7 und TLR8) [10]. Ihre transendotheliale Migration wird durch Fraktalkin (CX₃CL1) und den CX₃CR1 Rezeptor vermittelt. Nicht-klassische Monozyten sind wahrscheinlich weiter differenzierte Zellen als CD14⁺⁺CD16⁻ und CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten, da sie deutlich kürzere Telomere haben [47].

Obwohl quantitativ intermediäre Monozyten die geringsten Zellzahlen im zirkulierenden Blut aufweisen, ermöglicht dennoch ihre Expression eines breiten Spektrums von Chemokinrezeptoren, das CCR2, CCR5 und CX₃CR1 umfasst, eine bedeutende Rolle in der Progression der Atherosklerose. So konnten in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe die Zellzahlen der intermediären Monozyten, nicht jedoch die Zellzahlen anderer Monozytensubpopulationen, als unabhängige Prädiktoren für kardiovaskuläre Ereignisse sowohl bei Dialysepatienten [27] als auch bei Patienten mit früheren Stadien der chronischen Nierenerkrankung [59] und sogar bei kardiovaskulären Risikopatienten ohne manifeste Nierenerkrankungen [60] aufgezeigt werden.

4.3 Das phosphaturische Hormon FGF23 als potentieller Immunmodulator

Neben der chronischen Mikroinflammation stellt der derangierte Calcium-Phosphat-Haushalt bei nierenkranken Menschen einen weiteren zentralen nicht-klassischen kardiovaskulären Risikofaktor bei CKD dar. Diese Störungen des Calcium-Phosphat-Haushaltes bei CKD werden als CKD-Mineral- und Knochenstörungen („mineral and bone disorder“; CKD-MBD) bezeichnet, welche sich im Verlaufe der Progredienz der CKD als erstes durch eine Erhöhung des phosphaturischen Hormons FGF23 („Fibroblast Growth Factor 23“; Fibroblasten Wachstumsfaktor 23) äußern [32].

Das 2000 erstmals beschriebene [78] FGF23 ist ein 251 Aminosäuren umfassendes Hormon, das von Osteozyten und Osteoblasten sezerniert wird [57]. Der klassische Effekt von FGF23 in der Niere und in den Nebenschilddrüsen wird durch die Bindung von FGF23 an die FGF23 Rezeptoren (FGFRs) in Anwesenheit des Korezeptors Klotho vermittelt [74]. Die physiologische Wirkung von FGF23 ist die Senkung des systemischen Phosphatspiegels, die einerseits durch die Internalisierung des im proximalen Tubulus gelegenen Natrium-Phosphat Kotransporters [69] mit nachfolgend verringerter renaler Phosphatrückresorption und andererseits durch die Inhibition der 1- α -Hydroxylase [67] als Schlüsselenzym der Synthese von 1,25 (OH)₂ Cholecalciferols mit nachfolgend verringerter intestinaler Phosphataufnahme vermittelt wird. Schließlich inhibiert FGF23 auch die Parathormonsekretion [5].

Diese Regulation erlaubt, dass gesunde Menschen ihren Serumphosphatspiegel in einem engen Bereich konstant halten können, da FGF23 parallel zu einer Phosphataufnahme ansteigt [77]. Hierbei ist vermutlich nicht die Phosphataufnahme selbst der Stimulus für die Sekretion von FGF23 [44], sondern 1,25 (OH)₂ Cholecalciferol [44] und PTH [39]. 1,25 (OH)₂ Cholecalciferol reguliert dabei die Transkription von FGF23 durch einen Effekt am FGF23 Promotor [44].

Chronisch nierenkranke Menschen haben hingegen schon in frühen Stadien der CKD erhöhte FGF23 Werte [38], die während der Progredienz der Nierenerkrankung exponentiell ansteigen und bei Erreichen der Dialysepflichtigkeit gegenüber nierengesunden Menschen um mehr als den Faktor 100 erhöht sind [77]. Dieser exponentielle Anstieg von FGF23 wird aktuell einerseits mit dem Verlust funktionsfähiger Nephrone, andererseits mit einem zusätzlichen Klotho Defizit bei CKD erklärt, woraus eine partielle FGF23 Resistenz resultiert, so dass zur Erhaltung physiologischer Phosphatspiegel deutlich höhere FGF23 Werte erforderlich sind

[48]. Eine solche FGF23 Resistenz konnte bereits bei der Glandula parathyroidea [19] und im Gefäßsystem [43] aufgezeigt werden, wo eine Herunterregulierung des Klotho-FGFR Komplexes auftritt, die zu den Phänomenen des sekundären Hyperparathyreoidismus und einer verstärkten vaskulären Kalzifizierung bei CKD beitragen. Eine ähnliche Resistenz wird in der Niere vermutet.

Obgleich somit der exponentielle Anstieg von FGF23 hilft, CKD Patienten zumindest in früheren CKD Stadien vor einer Hyperphosphatämie zu schützen, konnte dennoch erhöhtes FGF23 als Prädiktor für die kardiale Ereignisrate und Mortalität nierenkranker Patienten [22, 33, 36], wie auch bei Menschen ohne eingeschränkte Nierenfunktion [3] erkannt werden.

Inwieweit FGF23 bloßer Marker oder aktiver Mediator kardiovaskulärer Ereignisse ist, war lange Zeit unklar. Erst 2011 konnte erstmals im Tiermodell eine direkte schädigende Wirkung von FGF23 im Herz-Kreislaufsystem aufgezeigt werden, nachdem eine Klotho-unabhängige Wirkung von FGF23 im Kardiomyozyten beschrieben wurde, der über den PLC γ -Calcineurin Signalweg eine myokardiale Hypertrophie anregt [15].

Die linksventrikuläre Hypertrophie ist ein wichtiger Mechanismus der kardiovaskulären Erkrankung bei CKD Patienten, die initial zur diastolischen Dysfunktion, in späteren Stadien aber auch zur Herzinsuffizienz, zur Arrhythmie und zum plötzlichen Herztod dieser Patienten beiträgt [17]. Neben diesem kardiovaskulären Schädigungsmechanismus konnte schließlich im Jahr 2013 zudem erstmals eine mögliche proinflammatorische Wirkung von FGF23 aufgezeigt werden: So wurden auf peripheren mononukleären Zellen des Blutes („peripheral mononuclear blood cells“; PBMCs) FGF23 Rezeptoren beschrieben, deren Stimulation über den Akt Signalweg die Transkription von CYP27B1, welches für die 1- α -Hydroxylase als zentrales Enzym in der Bildung von 1,25 (OH) $_2$ Cholecalciferol kodiert, herunterreguliert wird [4].

4.4 Zielsetzung

Vor diesem Hintergrund soll die vorliegende Arbeit überprüfen, ob FGF23 einen Einfluss auf die Monozytensubpopulationen hat und zur Monozytendysfunktion beiträgt. Dazu soll zunächst in zwei Kollektiven von nierengesunden (HOM sweet HOME Studie) und nierenkranken Menschen der Zusammenhang zwischen Monozytensubpopulationen und FGF23 epidemiologisch untersucht werden.

Nachfolgend soll in einem experimentellen Teil der Dissertationsarbeit ein etwaiger Effekt von FGF23 auf die Monozytenbiologie subpopulationsspezifisch untersucht werden. Hierzu soll überprüft werden, ob sich die Expression der FGF23 Rezeptoren auf den verschiedenen Monozytensubpopulationen unterscheidet und ob FGF23 eine direkte (patho)physiologische Wirkung auf eine bestimmte Monozytensubpopulation ausübt. Dazu sollen sowohl ausdifferenzierte Monozyten als auch sich differenzierende Monozyten mit FGF23 stimuliert und die Verteilung der Monozytensubpopulationen, die Expression proatherogener Marker (CCR5, CX₃CR1) und ihre funktionellen Eigenschaften (ROS Bildung, Aktivierung von T-Zellen, Phagozytoserate) nachfolgend analysiert werden.

5. Materialien

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Countess automated cell counter	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Durchflusszytometer BD FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
pH-Meter HI211	Hanna instruments, Kehl am Rhein, Deutschland
Quadro MACS Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

Tabelle 2: Antikörper

Antikörper	Klon	Konjugat	Bezugsquelle
Anti-CD3	SK7	APC	BioLegend, London, UK
Anti-CD14	MφP9	PerCP	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Anti-CD16	3G8	PE-Cy	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Anti-CD34	581	APC	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Anti-CD45	2D1	PE	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Anti-CD86	HA5.2B7	PE	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Anti-CD195 (CCR5)	2D7	APC	BD Bioscience,

Materialien

			Heidelberg, Deutschland
Anti-CX ₃ CR1	2A9-1	FITC	Biozol Diagnostica Eching, Deutschland
Anti-FGFR1	polyclonal	Alexa Fluor 488	www.antibodies- online.de
Anti-FGFR2	98725	APC	Neuromics, Hiddenhausen Germany
Anti-Klotho	polyclonal	Alexa Fluor 488	www.antibodies- online.de

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
5-(und-6)-Carboxy-2',7'-dihydro-fluorescein-Diacetat (H2DFFDA)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester (CFDA-SE)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Cytometer Setup & Tracking Beads	Biosciences, Heidelberg, Deutschland
100 % Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fluoresbrite YG Carboxylate Microspheres (0,75 µm) (1,08 x 10 ¹¹ Partikel/ml)	Polysciences Inc., Eppelheim, Deutschland
Rekombinantes FGF23 aus HEK 293 Zellen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Materialien

Rekombinantes FGF23 aus NS0 Zellen	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Humanes Serum Albumin (HSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
95 % Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rainbow Calibration Particles (6,0-6,4 µm)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
<i>Staphylococcus</i> Enterotoxin B (SEB)	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
0,4 % Tryptanblau	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 4: Kits und Enzyme

Kit/Enzym	Bezugsquelle
CD34 Microbead Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

Tabelle 5: Gebrauchsfertige Puffer, Lösungen und Medien

Puffer/Lösung/Medium	Bezugsquelle
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
FACS-Clean	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS-Flow	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS-Rinse	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Hematopoietic Progenitor Cell Expansion	Promo Cell GmbH, Heidelberg, Germany

Materialien

Medium DXF mit Cytokine Mix E (TPO,

SCF, flt3-Ligand, IL-3)

Hematopoietic Progenitor Medium

Promo Cell GmbH, Heidelberg, Germany

LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium

PAA Laboratories GmbH, Cölbe,

Deutschland

RPMI 1640 Medium

Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Tabelle 6: Puffer, Lösungen und Medien

Puffer/Lösung/Medium	Substanz	Menge
10 % EDTA	EDTA	10 g
	Aqua dest.	100 ml
3 % Essigsäure	100 % Essigsäure	3 ml
	Aqua dest.	97 ml
FACS-Puffer	PBS	500 ml
	FCS hitzeinaktiviert	25 ml
	BSA (pH7)	2,5 g
	10 % NaN ₃	3,5 ml
	10 % EDTA	1 ml
Krebs' Ringer PBS	Glucose (wasserfrei)	20,4 mg
	PBS (mit Ca und Mg)	20 ml
Labeling Lösung	PBS/1 % HSA	5 ml
	CFDA-SE 10 mM	5 µl
Lysepuffer	Lysing Solution	50 ml

Materialien

	Aqua dest.	450 ml
MACS-Puffer	PBS/5 mM EDTA	48,75 ml
	20 % HSA	1,25 ml
Markiermedium	RPMI 1 %	48,75 ml
	1 % Penicillin/Streptomycin	1,25 ml
	5 % HSA	
PBS/1 % HSA	PBS	49,75 ml
	20 % HSA	250 µl
PBS/5 mM EDTA	PBS	500 ml
	EDTA 500 mM	5 ml
4 % PFA	PFA	8 g
	PBS	200 ml
1 % PFA	4 % PFA	25 ml
	PBS	75 ml
RPMI	RPMI 1640	500 ml
Penicillin/Streptomycin	1 % Penicillin/Streptomycin	5 ml
Wachstumsmedium	RPMI 1640	47,5 ml
	1 % Penicillin/Streptomycin	
	FCS	2,5 ml

6. Methoden

6.1 KLINISCHER STUDIENPART

In Ergänzung zu den experimentellen Untersuchungen soll vorab die klinische Bedeutung etwaiger immunologischer Effekte von FGF23 in zwei klinisch-epidemiologischen Untersuchungen analysiert werden.

6.1.1 HOM sweet HOMe Studie

Heterogeneity of monocytes in subjects who undergo elective coronary angiography – The Homburg evaluation

Die prospektive HOM sweet HOMe Studie rekrutierte zwischen 2008 und 2011 Patienten, die stationär in die Innere Medizin III - Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin – des Universitätsklinikums des Saarlandes zur elektiven Koronarangiographie aufgenommen wurden. Bei stationärer Aufnahme wurde den Patienten die Studie vorgestellt und die Möglichkeit der Teilnahme erklärt.

Die Studie wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Michael Böhm, Dr. Bodo Cremers und Prof. Dr. Bruno Scheller (Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums des Saarlandes) durchgeführt; die Rekrutierung der Patienten erfolgte im Rahmen eigenständiger Promotionsarbeiten (Jana Jeken, Charlotte Steimle, Florian Hornof, Niko Rebling).

Einschlusskriterien:

- Patienten vor elektiver Koronarangiographie
- Einwilligung der Patienten nach Aufklärung
- Alter > 18 Jahre

Ausschlusskriterien:

- Systemische immunsuppressive Therapie
- Aktive Tumorerkrankung

Bei Studieneinschluss wurden folgende Parameter erfasst:

- Traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren
- Traditionelle Parameter des Calcium-Phosphat-Haushaltes (Plasma-Calcium, Plasma-Phosphat, Plasma-FGF23 (c-terminales FGF23))
- Linksventrikuläre Funktion mittels Lävographie (bei 1001 Patienten bestimmt)
- Bestimmung der Monozytensubpopulationen (bei 951 Patienten bestimmt)

Es wurden 1368 Patienten rekrutiert, von denen 32 wegen inkompletter Datensammlung oder nicht stattgefundener Koronarangiographie ausgeschlossen wurden.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit erfolgte bei den 951 Teilnehmern, bei denen bei Studieneinschluss subpopulationsspezifisch Monozytenzahlen bestimmt wurden, eine Analyse der Assoziationen zwischen FGF23 und Monozytenzahlen durch die Verfasserin der Dissertationsarbeit. Weitere Analysen zu FGF23 und subpopulationsspezifischen Monozytenzahlen sind in eigenständigen Publikationen darstellt [60, 65].

6.1.2 Dialysestudie

In der Studie wurden von der Verfasserin der Dissertationsarbeit 46 hämodialysepflichtige Patienten rekrutiert, die regelmäßig 2-4-mal pro Woche im Universitätsklinikum des Saarlandes in der Inneren Medizin IV - Nieren- und Hochdruckkrankheiten – dialysiert wurden. Die Studie wurde den Patienten vorgestellt und die Möglichkeit der Teilnahme erläutert.

Einschlusskriterien:

- Chronische Hämodialysepatienten
- Einwilligung der Patienten nach Aufklärung
- Alter > 18 Jahre

Ausschlusskriterien:

- Inkomplette Datenerhebung
- Systemische immunsuppressive Therapie
- Aktive Tumorerkrankung

Bei allen Studienteilnehmern wurden folgende Parameter erfasst und dokumentiert:

- Traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren
- Traditionelle Parameter des Calcium-Phosphat-Haushaltes (Plasma-Calcium, Plasma-Phosphat)
- Bestimmung der Monozytensubpopulationen
- c-terminales FGF23 vor und nach der Dialyse

6.2 EXPERIMENTELLER STUDIENPART

6.2.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie („Fluorescence Activated Cell Sorting“; FACS) erlaubt, verschiedene Zellen mittels eines Lasers zu unterteilen und zu analysieren. Dazu werden die Zellen zunächst mit spezifischen, konjugierten Antikörpern angefärbt. Bei der nachfolgenden Messung wird die Zellsuspension durch Überdruck in die Messküvette gezogen, wo dann die einzelnen Zellen mit einem Laser bestrahlt werden. Durch die große Anzahl von Zellen bei der Analyse innerhalb eines sehr kurzen Zeitintervalls ($>1000/\text{sec}$) erhält man rasch repräsentative Informationen über Zellpopulationen. Das entstehende Vorwärtsstreulicht („Forward Scatter“; FSC) und Seitwärtsstreulicht („Side Scatter“; SSC) sowie das Fluoreszenzlicht Fluorophor-gekoppelter Antikörper wird durch unterschiedliche Photomultiplikatoren verstärkt und gemessen. Das Vorwärtsstreulicht wird durch die Beugung des Lichtes anhand seiner Achse erzeugt und ist somit abhängig von der Größe der Zellen. Das Seitwärtsstreulicht ist dagegen abhängig von der Beschaffenheit der Zellen, insbesondere ihrer Granularität und Struktur. Die Fluorophor-gekoppelten Antikörper erlauben, durch Bestimmung der Fluoreszenzstärke die Expression von Oberflächenproteinen oder intrazellulären Proteinen zu quantifizieren.

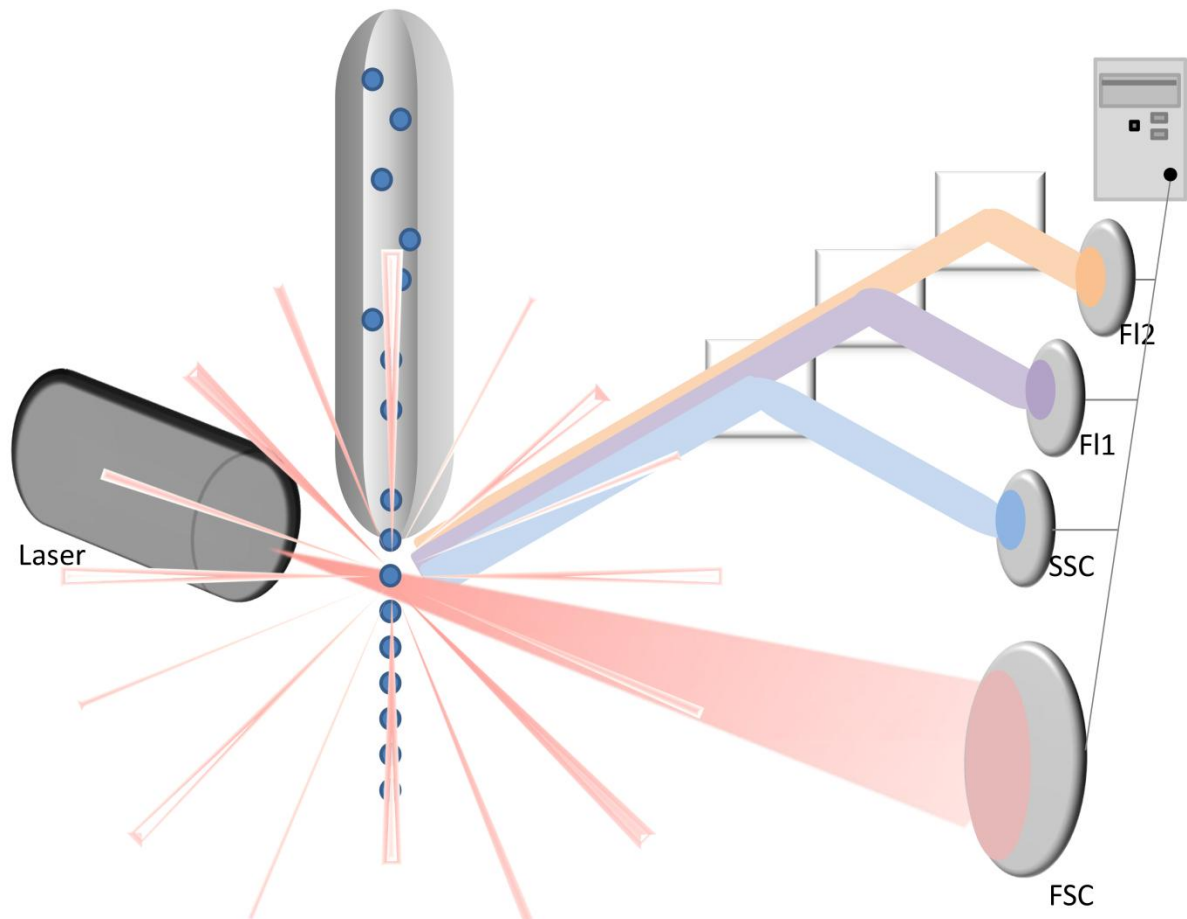


Abbildung 1: Schema der Durchflusszytometrie: Laserstrahlen treffen auf Zellen, die durch die Lichtbrechung mittels Vorwärtsstreulicht (FSC), Seitwärtsstreulicht (SSC) und Fluorophor-gekoppelte Antikörper charakterisiert werden können. Fluoreszenzphotodetektor 1 (F1), Fluoreszenzphotodetektor 2 (F2).

Dies ist auch für mehrere Fluorophore möglich, solange sich ihre Emissionsspektren unterscheiden. Die gemessenen Signale werden in einem Histogramm oder Dot Plot abgebildet. Zellen mit ähnlicher Größe und Granularität können mit dem sogenannten Gating zu Zielpopulationen zusammengefasst werden.

Gating der Monozytensubpopulationen

Die erste Charakterisierung der Zellpopulationen geschieht mit dem Panmonozytenmarker CD86, den Monozyten im Gegensatz zu Lymphozyten und Granulozyten auf ihrer Oberfläche exprimieren, in einem SSC/CD86 Dot Plot (Abbildung 2). Nach dieser groben Orientierung, werden die Zellen in einem SSC/FSC Dot Plot weiter gated (siehe Abbildung 3).

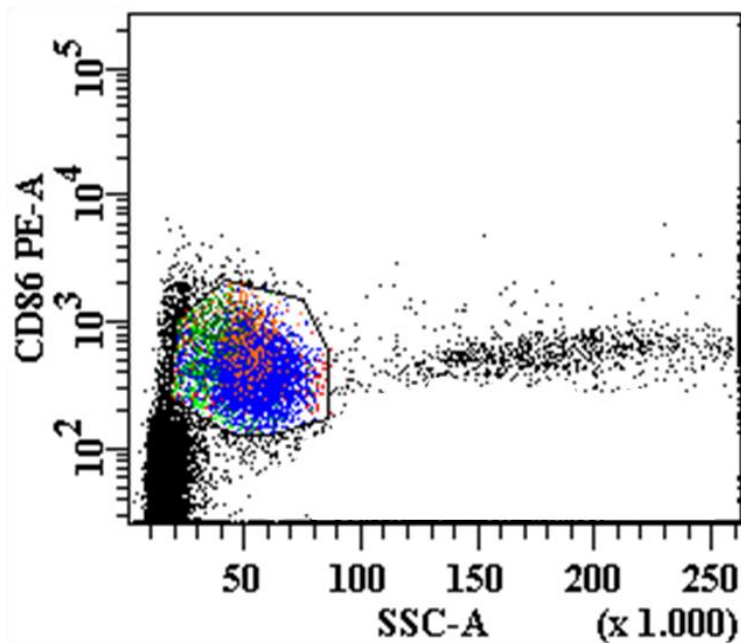


Abbildung 2: Gating der Gesamtmonozyten nach der Expression des Panmonozytenmarkers CD86 und des Seitwärtsstreulichts.

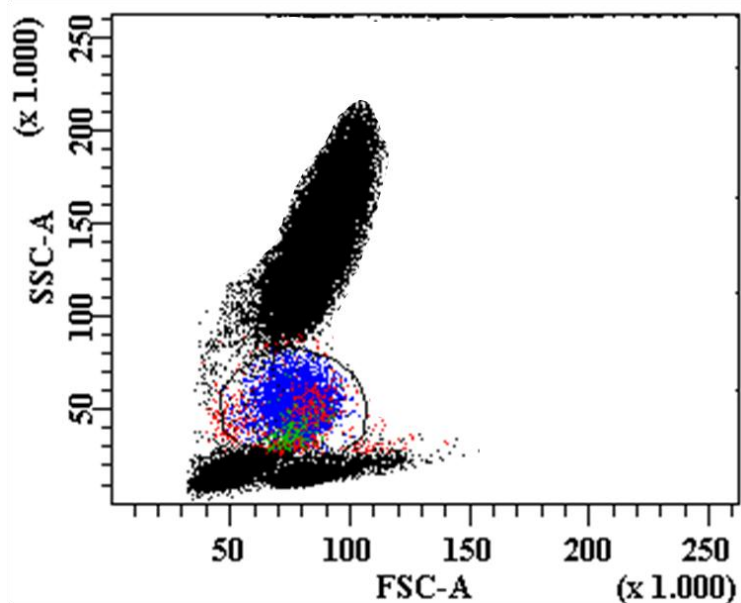


Abbildung 3: Einteilung der Zellpopulationen im Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC).

Durch die unterschiedliche Expression des LPS Rezeptors CD14 und des FC γ III Rezeptors CD16 lassen sich die drei folgenden Monozytensubpopulationen unterscheiden: CD14⁺⁺CD16⁻, CD14⁺⁺CD16⁺ und CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten, wie Abbildung 4 zeigt.

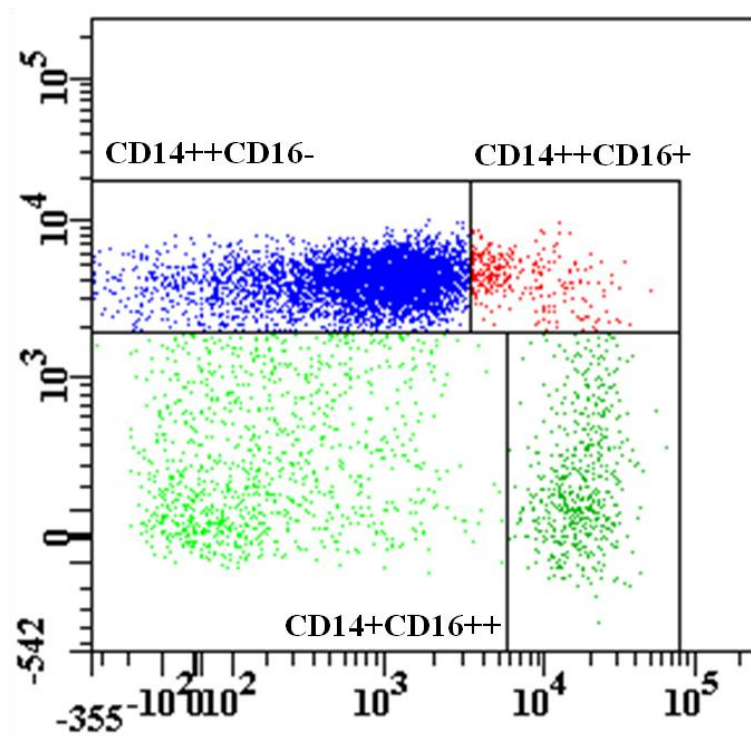


Abbildung 4: Monozytensubpopulationen eingeteilt nach der CD14 und CD16 Expression in klassische Monozyten CD14++CD16-, intermediäre Monozyten CD14++CD16+ und nicht-klassische Monozyten CD14+CD16++.

6.2.2 Monozytenfärbung im Vollblut

Für die Darstellung der Monozytensubpopulationen wurden die Monozyten gefärbt und mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es wurden 100 µl antikoagulierte EDTA Vollblut mit 2 ml FACS Puffer gevortext und 7 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und folgende Antikörpermischung hinzugegeben:

Anti-CD86-PE: 5 µl

Anti-CD14-PerCP: 4 µl

Anti-CD16-PeCy7: 0,5 µl

FACS-Puffer: 60,5 µl

Der Ansatz wurde kurz gevortext und dann bei 4°C 30 Minuten im Dunklen inkubiert. Danach erfolgte die Lyse der Erythrozyten aus dem Ansatz durch Zugabe von 2 ml Lysingsolution. Nach einer 10 minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunklen wurde die Lyselösung wieder entfernt, indem der Ansatz 7 Minuten bei 1300 rpm

zentrifugiert und der Überstand abgesaugt wurde. Anschließend wurde nochmals mit 2 ml FACS Puffer gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals entfernt und das erhaltene Pellet mit 200 µl 1%igem Paraformaldehyd fixiert und nach vortexen am Durchflusszytometer gemessen.

6.2.3 Messung der Rezeptoren FGFR1, FGFR2, Klotho

Die Messung der Oberflächenrezeptoren erfolgte wie unter Punkt 6.2.2 beschrieben. Der Antikörpermischung wurden lediglich folgende Antikörper hinzugefügt:

Anti-FGFR1 Alexa Fluor 488:	20 µl
Anti-FGFR2 APC:	3,5 µl
Anti-Klotho Alexa Fluor 488:	3,5 µl

6.2.4 Vollblutstimulation

Die Stimulation von Vollblut erfolgte in Polypropylenröhrchen. Dazu wurde ein Ansatz aus 150 µl antikoagulierte EDTA Vollblut, verschiedenen Konzentrationen an FGF23 (siehe Ergebnisteil) und RPMI Medium angesetzt. Das Gesamtvolumen betrug 450 µl. Nach Vortexen wurden die Proben für 5 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte eine Färbung der Monozyten sowie der Oberflächenrezeptoren CCR5 und CX₃CR1 wie unter Punkt 6.2.2 beschrieben.

6.2.5 Isolation von PBMCs

Bei der Isolation von peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMCs) wurden ca. 13,5 ml antikoagulierte EDTA Vollblut in ein 50 ml Falcon pipettiert und mit einem PBS/5 mM EDTA-Gemisch auf 35 ml aufgefüllt und gut durchmischt.

Danach wurde 13 ml Lymphocyte Separation Medium (Ficoll) in ein 50 ml Falcon gefüllt und anschließend das zuvor hergestellte Gemisch aus EDTA Blut und PBS/5 mM EDTA auf das Separationsmedium pipettiert, ohne dass sich die Schichten vermischten.

Bei der anschließenden Zentrifugation bei 1400 rpm bei 20° C ohne Bremse bildeten sich, wie die Abbildung 5 zeigt, vier Phasen.

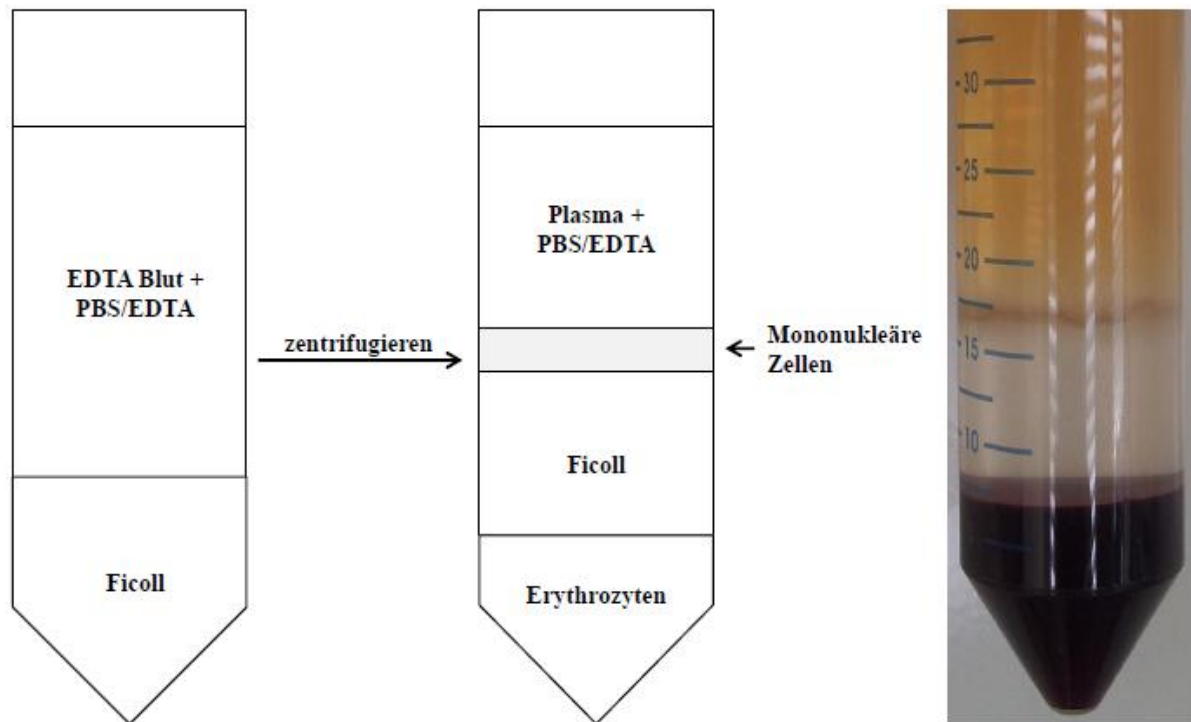


Abbildung 5: Trennung der PBMCs durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll

Ganz unten im Falcon lagen die toten Zellen, die Erythrozyten und die Granulozyten. Auf dem Ficoll befand sich eine weißliche Interphase, die hauptsächlich aus Monozyten und Lymphozyten bestand. Darüber lag eine Schicht aus Plasma, Thrombozyten und PBS-Gemisch.

Zur Weiterverwendung wurde die Schicht der mononukleären Zellen in ein neues Falcon pipettiert, mit dem PBS/5 mM EDTA-Gemisch auf 50 ml aufgefüllt und bei 1200 rpm, 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellett wurde weiter verarbeitet.

6.2.6 Isolation hämatopoetischer Stammzellen

Zur Isolation hämatopoetischer Stammzellen wurden die PBMCs, wie unter Punkt 6.2.5 beschrieben, aus 54 ml EDTA Blut isoliert. Die PBMCs ($\leq 10^8$) wurden in 300 μ l MACS Puffer aufgenommen und mit 100 μ l FcR Blocking Reagent und 100 μ l CD34 Microbeads

versetzt. Bei 4°C wurden die Zellen unter gelegentlichem Schwenken 30 Minuten im Dunklen inkubiert.

Danach wurden die Zellen mit 10 ml MACS Puffer gewaschen und wieder bei 1200 rpm, 4°C 10 Minuten zentrifugiert, abgesaugt und in 500 µl MACS Puffer aufgenommen.

Eine LS Säule wurde an einem Magneten befestigt und mit 3 ml MACS Puffer äquilibriert, bevor die Zellsuspension durch die Säule laufen gelassen wurde. Die Säule wurde 3-mal mit 3 ml MACS Puffer gespült, um unspezifisch gebundene Zellen zu entfernen. Der Durchlauf wurde verworfen. Anschließend wurde die Säule aus dem Magneten genommen und die CD34 positiven Zellen mit 5 ml MACS Puffer unter Druck heraus gespült.

Die Zellsuspension wurde für 10 Minuten bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt und in 500 µl MACS Puffer aufgenommen. Es erfolgte ein weiterer Aufreinigungsschritt mit Hilfe einer MS Säule. Die Säule wurde hierfür zunächst mit 500 µl äquilibriert. Die Zellsuspension wurde auf die Säule gegeben und 3-mal mit je 500 µl gespült, bevor man die Zellen mit 1 ml MACS Puffer heraus spülte.

Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Zellen, wurden 70 µl der Zellsuspension mit 20 µl CD34 und 20 µl CD45 Antikörpern gefärbt und am FACS gemessen (siehe Punkt 6.2.2).

6.2.7 Kultivierung und Expansion hämatopoetischer Stammzellen

Um eine ausreichende Menge an Zellen für nachfolgende Versuche zu haben, wurden die isolierten CD34+ hämatopoetischen Stammzellen expandiert. Dazu wurde die Zellsuspension in 5 ml Hematopoetic Progenitor Cell Expansion Medium DXF aufgenommen und mit 50 µl Wachstumsfaktoren (SCF, Flt3-Ligand, TPO, IL3) in einer 6-Well-Platte bei 37°C und 5 % CO₂ für 13 Tage kultiviert wurden. An Tag 8 erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden dazu in ein Falcon überführt, 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und erneut in Hematopoetic Progenitor Cell Expansion Medium mit den obigen Wachstumsfaktoren aufgenommen.

6.2.8 Zellzählung

Während der Expansion der hämatopoetischen Stammzellen wurde ihr Wachstum regelmäßig kontrolliert. Dazu wurde die Zellsuspension durchmischt, dann 10 µl entnommen, mit 10 µl

0,4 % Trypanblau gemischt und im Countess Automated Cell Counter gezählt. Der Vorgang wurde jeweils zweimal durchgeführt und der Mittelwert beider Messungen notiert.

6.2.9 Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu Monozyten

An Tag 13 der Expansion wurde die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen zu Monozyten durch die Änderung des Mediums angestoßen. Dazu wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon überführt und bei 20°C für 7 Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in Hematopoietic Progenitor Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde je nach Anzahl der verwendeten Stimulationen auf mehrere Wells aufgeteilt und mit FGF23 versetzt. Es gab immer noch ein zusätzliches Well als Kontrolle, dem kein FGF23 hinzugefügt wurde.

Die Zellen wurden 9 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und die Differenzierung zu Monozyten mittels Durchflusszytometrie verfolgt. Dazu wurden jeweils 100 µl Zellsuspension mit folgendem Antikörpermix versetzt:

Anti-CD86-PE: 5 µl

Anti-CD14-PerCP: 4 µl

Anti-CD16-PeCy7: 0,5 µl

FACS-Puffer: 60,5 µl

Nach 15 Minuten Inkubation bei 4°C im Dunkeln wurden die Zellen mit 2 ml FACS Puffer gewaschen, 7 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, das Zellpellet in 200 µl 1 % PFA aufgenommen und am Durchflusszytometer gemessen.

6.2.10 Proliferationsassay

Bei dem Proliferationsassay wurde untersucht ob Monozyten, die mit FGF23 stimuliert wurden, sich in der Proliferation von T-Zellen unterscheiden. Die Anzahl und Häufigkeit der Zellteilungen lassen sich durchflusszytometrisch mit Hilfe von CFDA-SE messen, das in die Zellen gelangt und bei der Teilung einer Zelle zu gleichen Teilen an die entstehenden Tochterzellen weitergegeben wird.

Es wurden zunächst die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wie in Punkt 7.2.5. beschrieben isoliert und mit PBS/5 mM EDTA gewaschen und 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Das so erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml PBS/1 % HSA und 2 x Labeling-Lösung (CFDASE) aufgenommen und für 10 Minuten bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank auf einem MACS Roller liegend inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurden 13 ml Makiermedium zugegeben und die Zellen für 10 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert.

Die PBMCs wurden dann in 15 ml Markiermedium aufgenommen und für 5 Minuten bei 37°C unter rollen inkubiert und anschließend wieder für 10 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt um die restliche Labeling Lösung zu entfernen. Anschließend wurden die PBMCs in einer Konzentration 600.000 PBMCs in je 60 µl Wachstumsmedium auf eine 96 Well-Platte verteilt. Dann wurde FGF23 in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Neben dem FGF23 wurde SEB in einer Endkonzentration 2,5 µg/ml hinzugefügt, sowie 240 µl Wachstumsmedium. Die Ansätze wurden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und an Tag 3 und 4 die Proliferation gemessen. Hierzu wurden die Zellsuspension gut gemischt und 150 µl entnommen. Die verbliebenen Zellen wurden verworfen. Das geleerte Well wurde zweimal mit jeweils 200 µl PBS gespült, wobei dieses zu den entnommenen Zellen hinzugefügt wurde. Dann wurde den Ansätzen 50 µl RPMI/2 mM EDTA zugegeben um Zell zu Zell Interaktionen zu lösen. Daraufhin erfolgte ein Waschschrift mit FACS Puffer und die Zentrifugation für 10 Minuten bei 1200 rpm. Das Zellpellet wurde in 70 µl FACS Puffer aufgenommen und mit 1 µl Anti CD3-APC Antikörper für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln zur Darstellung der T-Lymphozyten gefärbt. Anschließend wurden die Zellen in 250 µl 1 % PFA aufgenommen. Der Anteil der proliferierten CD3 positiven Zellen wurde per Durchflusszytometrie gemessen.

6.2.11 Messung der Phagozytoserate

Zur Untersuchung der Phagozytoserate der einzelnen Monozytensubpopulationen wurden Latexpartikel zunächst opsoniert. Es wurde eine Lösung aus 1 µl Latexpartikel (Endkonzentration 1×10^8 Partikel/ml), 500 µl einer Mischung aus drei verschiedenen humanen Seren, sowie 500 µl Krebs-Ringer PBS vermischt. Die Lösung wurde dann für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert.

An Tag 8 der Differenzierung wurden die unterschiedlich behandelten Monozyten auf ihre Phagozytose-Eigenschaften hin untersucht. Dazu wurden je 90 µl Zellsuspension mit je 10 µl

opsonierten Latexbeats bei 37°C für 30 Minuten inkubiert und danach, wie unter Punkt 6.2.2 beschrieben, für die Durchflusszytometrie gefärbt. Die Anzahl der FITC positiven Monozyten wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

6.2.12 Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies

Die reaktiven Sauerstoffspezies („Reactive Oxygen Species“; ROS) sind Produkte der Zellaktivität und entstehen u.a. teils ungewollt als Nebenprodukte bei der Zellatmung, teils gewollt u.a. bei der Phagozytose.

Intrazellulär auftretende Sauerstoffspezies können mithilfe von 5-(und-6)-Carboxy-2',7'-dihydrofluorescein-Diacetat (H2DFFDA) durchflusszytometrisch bestimmt werden. H2DFFDA diffundiert in die Zellen hinein und wird durch intrazelluläre Esterasen so gespalten, dass es seine Membrangängigkeit verliert. Reaktive Sauerstoffspezies oxidierten es zum fluoreszierenden DCF, so dass die Fluoreszenz danach mittels Durchflusszytometrie gemessen werden kann (Abbildung 6).

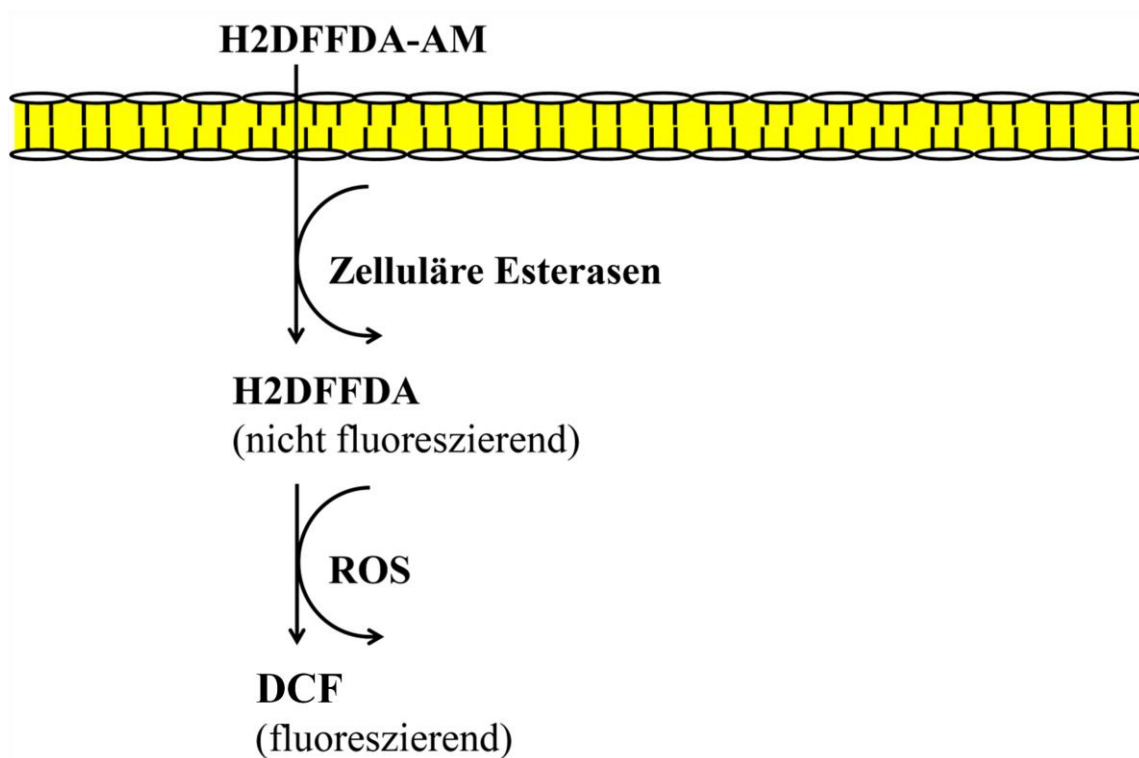


Abbildung 6: Wirkungsweise der ROS Nachweisreagenz 5-(und-6)-Carboxy-2',7'-dihydrofluorescein-Diacetat (H2DFFDA).

Methoden

Am 8 Tag der Differenzierung wurden je 200 µl Zellsuspension, 2,3 ml PBS/EDTA, 40 µl 2,5%iges H₂DFFDA in ein FACS Röhrchen gegeben, gevortext und 15 Minuten bei 37°C im Schüttelbad inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 1200 rpm 7 Minuten bei 4°C zentrifugiert, mit 2 ml FACS Puffer gewaschen und wie unter Punkt 6.2.2 beschrieben gefärbt. Das ROS Signal konnte durchflusszytometrisch als MFI des DCF gemessen werden.

6.3 STATISTIK

Die Datenverarbeitung und die statistische Auswertung der klinisch-epidemiologischen Daten erfolgte mit SPSS 21.0 (SPSS IMB USA), die Auswertung der experimentellen Studienergebnisse mittels Graphpad Prism 4 (La Jolla, USA).

Kontinuierliche Variablen sind als Mittelwert und Standardabweichung angegeben (bei fehlender Normalverteilung als Median [25 und 75 Quartile]), kategoriale Variablen als Anzahl (Prozent).

Der Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen erfolgte für kontinuierliche Variablen mittels einfaktoriellem ANOVA mit nachfolgende Dunns Test, für kategoriale Variablen mittels Chi Quadrat Test.

Im klinisch-epidemiologischen Studienteil wurde eine multiple lineare Regressionsanalyse mit kardiovaskulären Risikofaktoren, Plasma FGF23, Plasma Phosphat und Nierenfunktion als unabhängige Variablen und mit intermediären Monozytenzahlen als abhängige Variable durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine Assoziationen von FGF23 mit Zellzahl der intermediären Monozyten nach Korrektur für kardiovaskuläre Risikofaktoren und Nierenfunktion besteht.

Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ definiert.

7. Ergebnisse

7.1 KLINISCHER STUDIENPART

Zunächst sollte eine etwaige Assoziation zwischen Monozytensubpopulationen und FGF23 in zwei Patientenkohorten epidemiologisch überprüft werden.

7.1.1 Beziehung zwischen Monozyten und FGF23 im nierengesunden Patientenkollektiv

Eine Gesamtzahl von 1368 Patienten vor elektiver Koronarangiographie wurde in die HOM sweet HOME Studie eingeschlossen. Bei 951 konnten Monozytensubpopulationen und FGF23 bestimmt werden. In Tabelle 7 sind die Baseline Charakteristika nach Stratifizierung der Probanden in FGF23 Quartilen aufgelistet. Die Patienten in höheren FGF23 Quartilen wiesen erwartungsgemäß eine niedrigere GFR, höheres Plasma-Kreatinin und höheres Plasma-Phosphat auf. Weiterhin waren höhere FGF23 Werte mit niedrigerem Plasma-Gesamtcholesterin, weiblichem Geschlecht und prävalentem Diabetes Mellitus assoziiert.

Tabelle 7: Baseline Charakteristika der HOM sweet HOME Studienteilnehmer

FGF23 C-terminal Quartile	Gesamt (N = 951)	Quartil 1 (N = 238) (7,6 – 54,6 RU/ml)	Quartil 2 (N = 237) (54,7 - 74,9 RU/ml)	Quartil 3 (N = 238) (75,0 – 108,2 RU/ml)	Quartil 4 (N = 238) (108,6 - 4665 RU/ml)	P Wert
Alter (Jahre)	65,2 ± 10,2	63,4 ± 10,2	68,8 ± 9,5	65,6 ± 10,5	66,4 ± 10,5	< 0,001
BMI (kg/m ²)	28,5 ± 4,6	28,0 ± 4,4	28,5 ± 4,6	28,2 ± 4,3	28,8 ± 5,0	0,055
Syst BD (mmHg)	147 ± 22	146 ± 22	148 ± 21	149 ± 21	145 ± 23	0,752
Dia BD (mmHg)	82 ± 11	81 ± 9	83 ± 10	82 ± 10	81 ± 12	0,146
CRP (mg/l)	1,9 (0,9-4,0)	1,5 (0,8-3,5)	1,6 (0,8-3,3)	2,0 (1,1-4,6)	2,7 (1,4-5,7)	0,004
Kreatinin (mg/dl)	1,02 ± 0,35	0,93 ± 0,27	0,95 ± 0,24	1,00 ± 0,25	1,15 ± 0,52	< 0,001
eGFR EPI (ml/min./1,73m ²)	75 ± 20	82 ± 17	79 ± 17	75 ± 18	66 ± 23	< 0,001
Phosphat (mg/dl)	3,3 ± 0,6	3,2 ± 0,6	3,3 ± 0,5	3,3 ± 0,5	3,5 ± 0,6	< 0,001
Cholesterin (mg/dl)	187 ± 47	189 ± 46	189 ± 51	187 ± 45	183 ± 44	0,021
Triglyceride (mg/dl)	160 ± 139	150 ± 109	156 ± 106	152 ± 97	179 ± 209	0,768
Leukozyten (A/μl)	6701 ± 1951	6397 ± 1558	6699 ± 1996	6720 ± 2151	6932 ± 1957	0,005

Ergebnisse

Monozyten (A/ μ l)	581 \pm 210	540 \pm 117	590 \pm 215	570 \pm 198	619 \pm 23	0,005
Raucher	122 (12,6 %)	24 (10,1 %)	26 (11,0 %)	42 (17,6 %)	30 (12,8 %)	0,063
Geschlecht (w)	305 (32,1 %)	64 (26,9 %)	57 (24,1 %)	75 (31,5 %)	109 (45,8 %)	< 0,001
Diabetes Mellitus	363 (38,2 %)	79 (33,2 %)	76 (32,1 %)	88 (37,0 %)	120 (50,4 %)	< 0,001
kardio-vaskuläre Erkrankungen vor Aufnahme	568 (59,7 %)	134 (56,3 %)	144 (60,8 %)	130 (54,6 %)	160 (67,2 %)	0,024

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung oder respektive Anzahl (Prozent), bei CRP Median und 25 bzw 75 Quartile
eGFR EPI (estimated glomerular filtration rate Epidemiology Colaboration Institute)
Syst BD (systolischer Blutdruck)
Dia BD (diastolischer Blutdruck)
BMI (Body Mass Index)

Bei Betrachtung der Leukozyten- und Monozytenzahlen in den verschiedenen FGF23 Quartilen zeigten sich höhere Gesamtleukozyten- und Monozytenzahlen in höheren FGF23 Quartilen. Bei individueller Betrachtung der Monozytensubpopulationen lässt sich ein Zusammenhang zwischen den Zellzahlen der einzelnen Monozytensubpopulationen erkennen (Abbildung 7-9), der bei den intermediären Monozyten am deutlichsten imponierte (Abbildung 8).

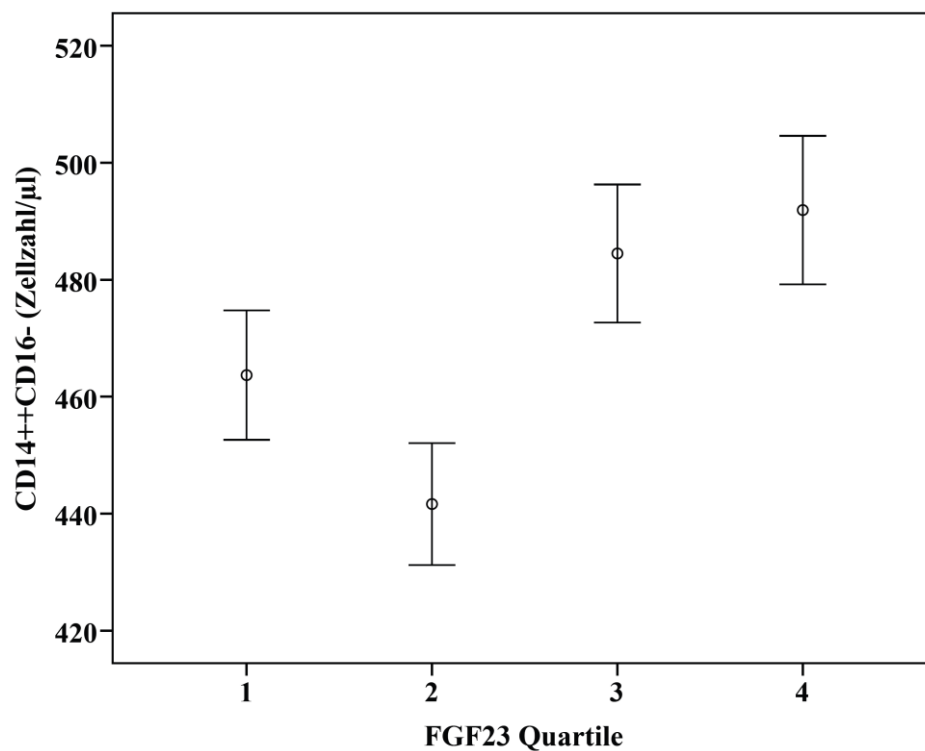


Abbildung 7: Anzahl der klassischen Monozyten nach Stratifizierung der Probanden in FGF23 Quartile; dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler; ANOVA p for trend = 0,014

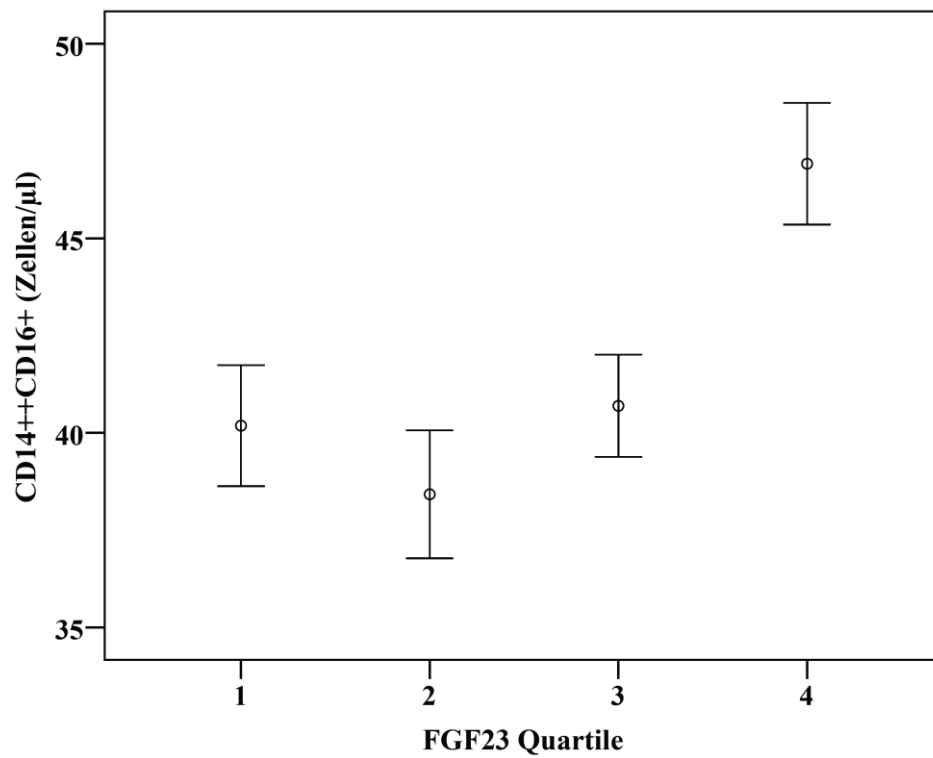


Abbildung 8: Anzahl der intermediären Monozyten nach Stratifizierung der Probanden in FGF23 Quartile; dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler; ANOVA p for trend < 0,001

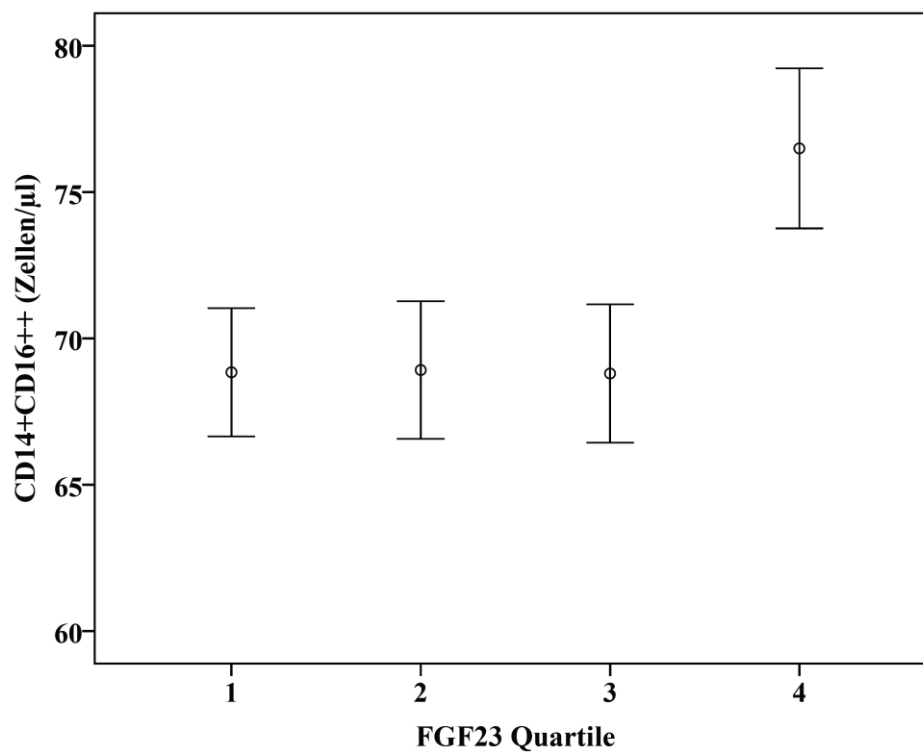


Abbildung 9: Anzahl der nicht-klassischen Monozyten nach Stratifizierung der Probanden in FGF23 Quartile; dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler; ANOVA p for trend = 0,035

Zur Überprüfung, ob dieser Zusammenhang zwischen FGF23 und intermediären Monozytenzahlen unabhängig von klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren und renalen Parametern ist, wurde eine multiple lineare Regressionsanalyse mit intermediären Monozytenzahlen als abhängige Variable durchgeführt. FGF23 blieb hierbei selbst nach Korrektur für die kardiovaskulären Risikofaktoren sowie der Nierenfunktion ein signifikanter Prädiktor der Anzahl intermediärer Monozyten (Tabelle 8).

Ergebnisse

Tabelle 8: Multiple lineare Regressionsanalyse mit intermediären Monozyten als abhängiger Variable

	Model 1			Model 2			Model 3			Model 4			Model 5		
	β	SEM	P	B	SEM	p	β	SEM	p	β	SEM	p	β	SEM	p
Konstante	22,522	4,530	<0,001	16,793	6,322	0,008	8,304	8,588	0,334	6,361	10,092	0,526	20,242	14,729	0,170
Log FGF23	9,477	2,321	<0,001	10,283	2,362	<0,001	9,374	2,386	<0,001	9,327	2,391	<0,001	6,904	2,602	0,008
Geschlecht (w)				-5,059	1,670	0,003	-4,444	1,690	0,009	-4,442	1,691	0,009	-5,078	1,764	0,004
Alter (Jahre)				0,104	0,077	0,173	0,202	0,082	0,014	0,208	0,084	0,013	0,122	0,095	0,199
Gesamtcholesterin (mg/dl)							-0,018	0,017	0,295	-0,017	0,017	0,303	-0,017	0,017	0,311
Diabetes mellitus							0,405	1,605	0,801	0,248	1,659	0,881	0,214	1,663	0,898
Syst BD (mmHg)							0,036	0,037	0,323	0,034	0,037	0,351	0,036	0,037	0,327
Nikotin							11,305	2,384	<0,001	11,292	2,396	<0,001	11,702	2,403	<0,001
BMI (kg/m ²)										0,066	0,175	0,707	0,051	0,175	0,771
eGFR EPI (ml/min./1,73m ²)													-0,100	0,050	0,045
Phosphat (mg/dl)													1,272	1,480	0,390
β (Regressionskoeffizient), SEM (standard error of the mean; Standardfehler), P Wert (Signifikanzniveau), Syst BD (systolischer Blutdruck), BMI (Body Mass Index), eGFR EPI (estimated glomerular filtration rate Epidemiology Colaboration Institute)															

7.1.2 Beziehung zwischen Monozyten zu FGF23 im nierenkranken Patientenkollektiv

Nachfolgend wurde untersucht, ob sich der signifikante Zusammenhang zwischen FGF23 und intermediären Monozytenzahlen auch auf ein nierenkrankes Patientenkollektiv übertragen lässt. Hierzu wurden 46 Patienten mit chronischer Nierenerkrankung CKD 5, die sich einer regelmäßigen Hämodialysetherapie unterzogen, rekrutiert; die Baseline Charakteristika dieser Kohorte sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Erwartungsgemäß wiesen die Dialysepatienten massiv höhere FGF23 Werte auf als die HOM sweet HOMe Studienteilnehmer. Patienten in der höchsten FGF23 Quartile wiesen höhere Plasma-Phosphat Werte auf; ansonsten konnten bei diesem deutlich kleineren Patientenkollektiv keine signifikanten Zusammenhänge zwischen FGF23 und klinischen Parametern erkannt werden.

Tabelle 9: Baselinecharakteristika der Dialysepatienten

FGF23 C -terminal Quartile	Gesamt (N = 46)	Quartil 1 (N = 11) (318-1012 RU/ml)	Quartil 2 (N = 11) (1111-2539 RU/ml)	Quartil 3 (N = 13) (2617-9571 RU/ml)	Quartil 4 (N = 11) (12791-56674 RU/ml)	P- Wert
Alter (Jahre)	66,5 ± 13,8	70,6 ± 20,5	69,3 ± 9,9	63,8 ± 11,4	62,6 ± 11,0	0,119
BMI (kg/m ²)	27,5 ± 5,3	28,5 ± 5,4	29,2 ± 5,3	27,7 ± 5,9	24,6 ± 3,8	0,080
Syst BD (mmHg)	136 ± 32	132 ± 24	137 ± 26	132 ± 26	145 ± 49	0,465
Dia BD (mmHg)	72 ± 16	72 ± 15	68 ± 15	72 ± 13	78 ± 20	0,318
CRP (mg/l)	4,6 (1,6-14,9)	4,3 (1,0-7,7)	4,9 (1,4-11,8)	2,7 (1,4-18,5)	7,2 (3,7-24,5)	0,505
Phosphat (mg/dl)	5,3 ± 2,1	4,3 ± 1,0	4,1 ± 1,5	5,3 ± 1,9	7,4 ± 2,3	<0,001
Vintage (Jahre)	4,3 ± 2,9	2,8 ± 1,8	5,4 ± 3,2	3,4 ± 1,9	5,9 ± 3,6	0,062
Leukozyten (A/μl)	6609 ± 2477	6782 ± 2766	7091 ± 2507	5946 ± 1878	6736 ± 2926	0,684
Monozyten (A/μl)	562 ± 322	520 ± 223	741 ± 531	466 ± 125	519 ± 218	0,516
Raucher	5 (11,1 %)	1 (9,1 %)	0	2 (15,4 %)	2 (20,0 %)	0,482
Geschlecht (w)	19 (41,3 %)	5 (45,5 %)	5 (45,5 %)	5 (38,5 %)	4 (36,4 %)	0,958
Diabetes Mellitus	20 (43,5 %)	5 (45,5 %)	6 (54,5 %)	7 (53,8 %)	2 (18,2 %)	0,262

Ergebnisse

Kardio-vask. Erkrankung vor Aufnahme *	9 (19,6 %)	3 (27,3 %)	2 (18,2 %)	2 (15,4 %)	2 (18,2 %)	0,900
Angaben sind Mittelwert und Standardabweichung oder respektive Anzahl (Prozent), bei CRP Median und 25 bzw 75 Quartile						
*Cerebro-vaskuläre Erkrankungen vor Aufnahme						
Syst BD (systolischer Blutdruck)						
Dia BD (diastolischer Blutdruck)						
Vintage: Zeit seit Dialysebeginn						

Bei subpopulationsspezifischer Betrachtung der Monozytenzahlen (siehe Abbildung 10-12) erkennt man tendenziell höhere Zellzahlen der intermediären Monozyten mit höheren FGF23 Werten; aufgrund der kleinen Kohortengröße erreicht dieser Zusammenhang jedoch kein Signifikanzniveau (Abbildung 11).

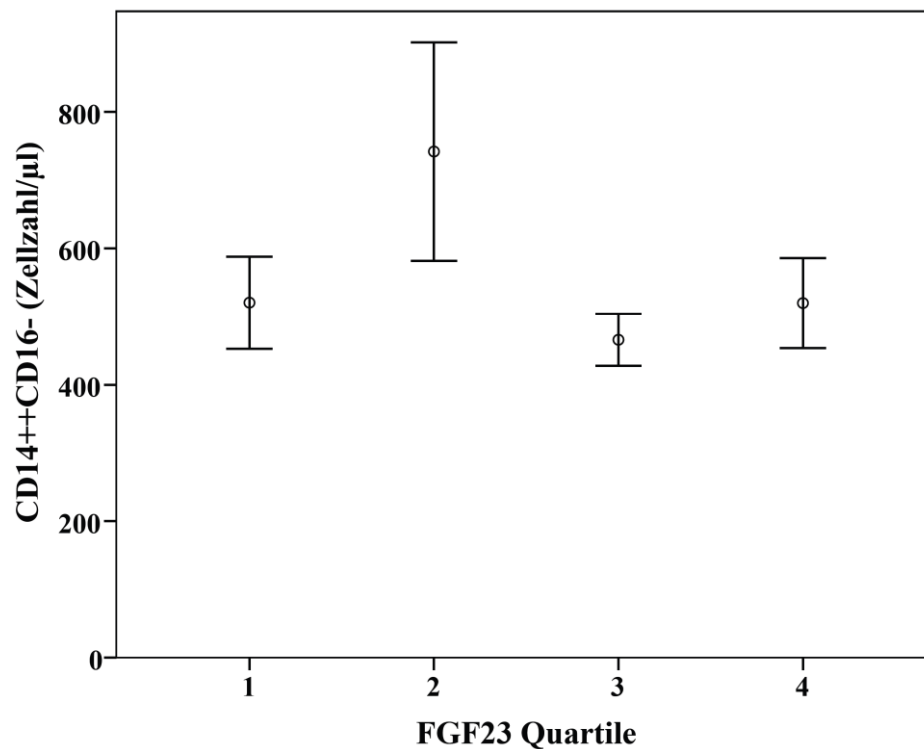


Abbildung 10: Anzahl der klassischen Monozyten nach Stratifizierung der Probanden in FGF23 Quartile; dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler; ANOVA p for trend p = 0,322

Ergebnisse

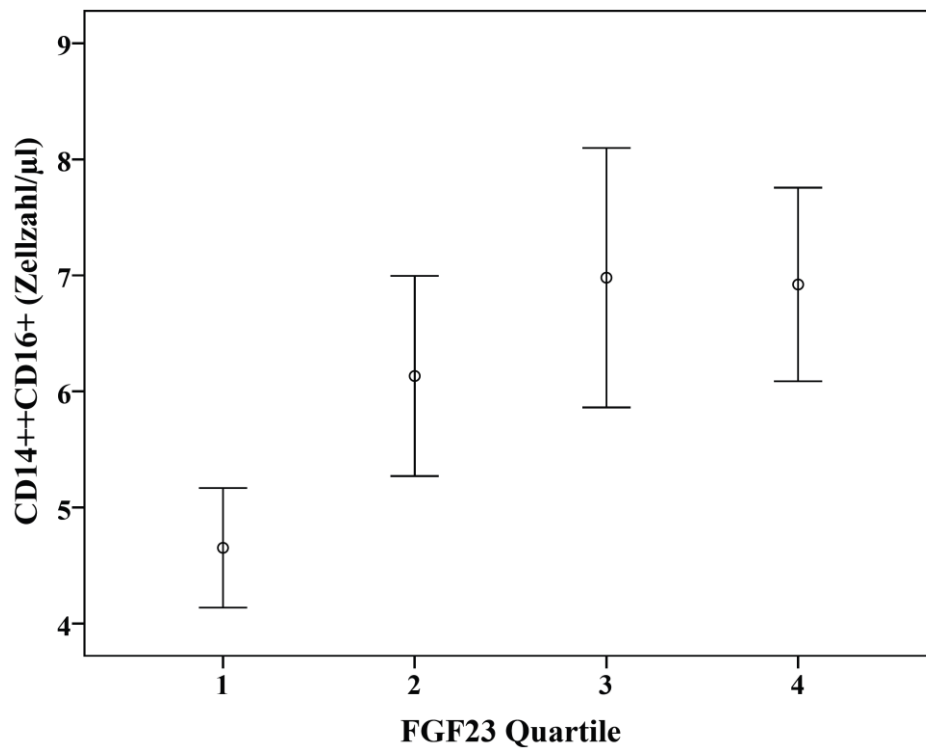


Abbildung 11: Anzahl der nicht-klassischen Monozyten nach Stratifizierung der Probanden in FGF23 Quartile; dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler; ANOVA p for trend = 0,550

Ergebnisse

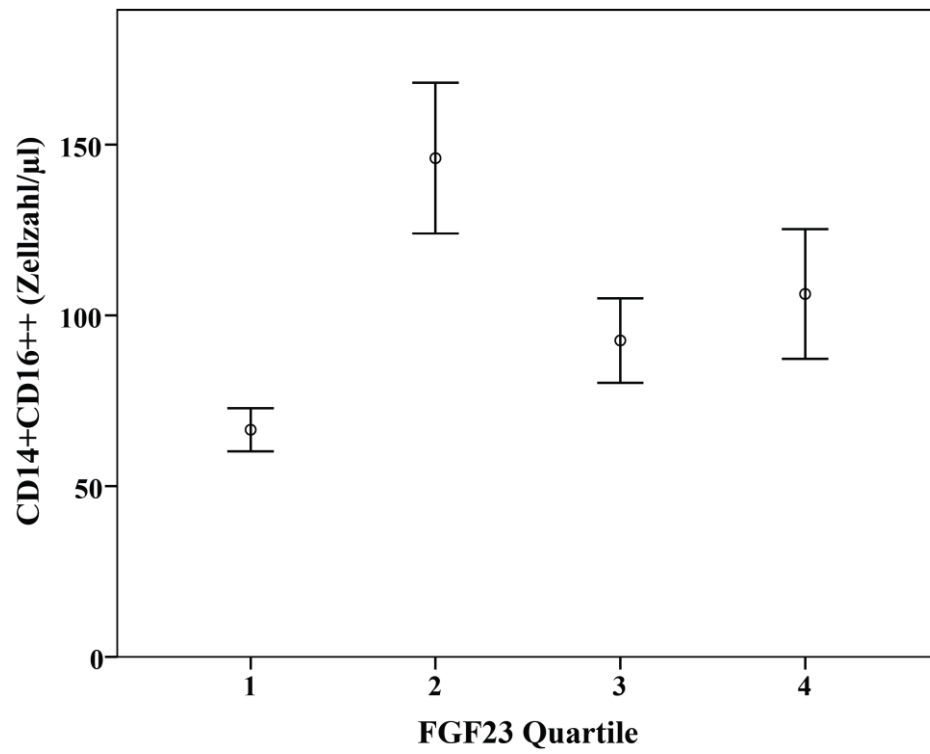


Abbildung 12: Anzahl der nicht-klassischen Monozyten nach Stratifizierung der Probanden in FGF23 Quartile; dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler; ANOVA p for trend = 0,358

7.2 EXPERIMENTELLER STUDIENPART

7.2.1 Verteilung der Monozytensubpopulationen bei

Dialysepatienten und gesunden Probanden

Dialysepatienten weisen im Vergleich zu gesunden Menschen eine Veränderung der Subpopulationen mit einer Abnahme klassischer Monozyten und Zunahme intermediärer und nicht-klassischer Monozyten auf (Abbildung 13).

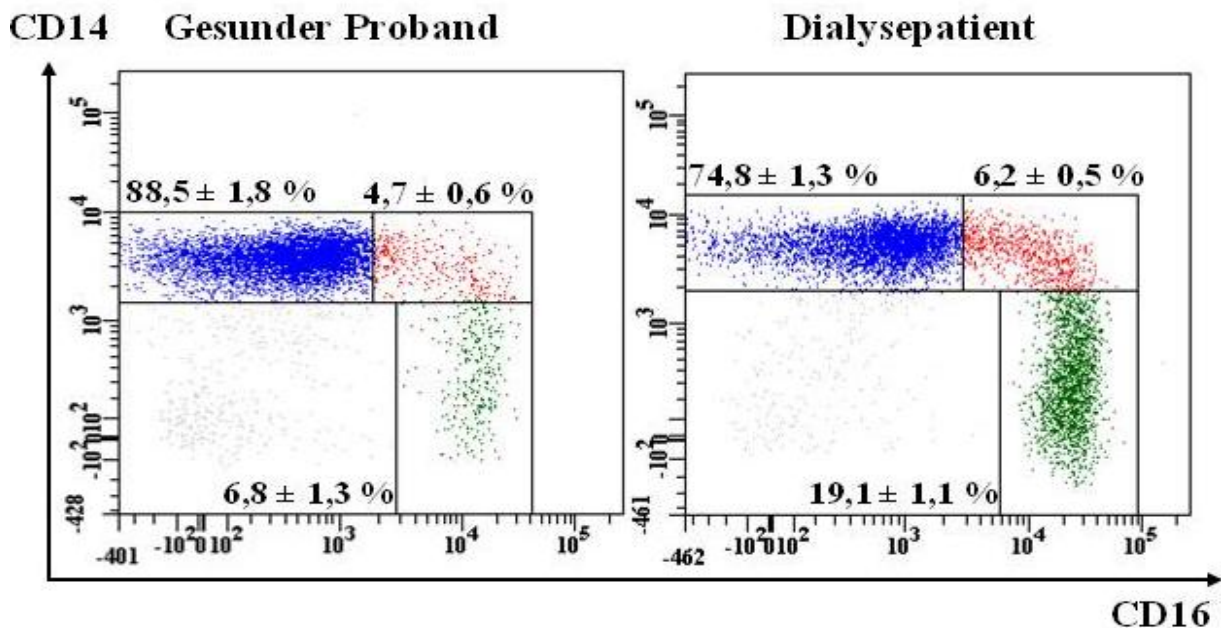


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Darstellung der Monozytensubpopulationen bei gesunden Probanden (n = 5) und Dialysepatienten (n = 45). Dargestellt sind zwei repräsentative durchflusszytometrische Analysen sowie Mittelwert und Standardabweichung aller Probanden.

7.2.2 Verteilung der FGF-Rezeptoren und Klotho auf den Monozytensubpopulationen

Zur Überprüfung, inwieweit die Monozytensubpopulationen von FGF23 beeinflusst werden können, wurde die Expression der FGFR1 und FGFR2 Rezeptoren sowie die des membranständigen Klothos mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Rezeptoren wurden auf allen drei Subpopulationen exprimiert (Abbildung 14-16). Jedoch unterschied sich die Expression subpopulationsspezifisch. Dabei wurde FGFR1 und Klotho am stärksten von den nicht-klassischen Monozyten exprimiert, während FGFR2 am stärksten von den

intermediären Monozyten exprimiert wurde. Es zeigten sich keine relevanten Unterschiede in der Expressionsrate der Rezeptoren bei Gesunden im Vergleich zu Dialysepatienten.

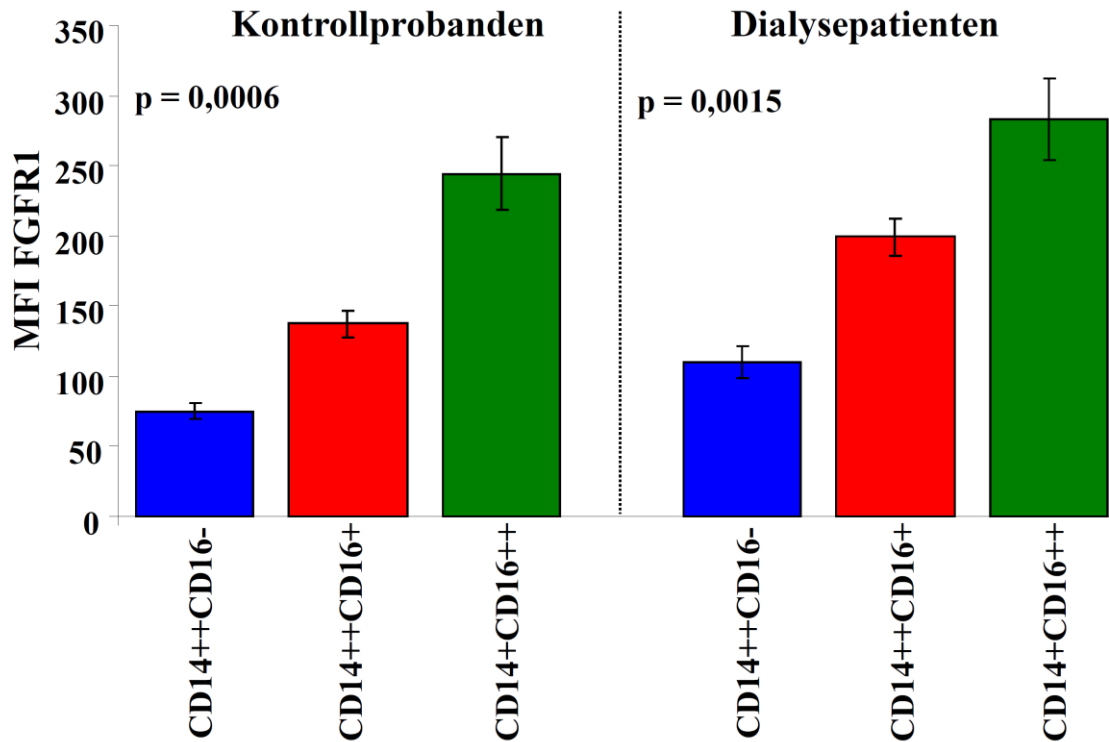


Abbildung 14: Expression des FGFR1 Rezeptors auf den drei Monozytensubpopulationen bei gesunden Kontrollprobanden (n = 6) und bei Dialysepatienten (n = 6). Statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunns Post-hoc Test.

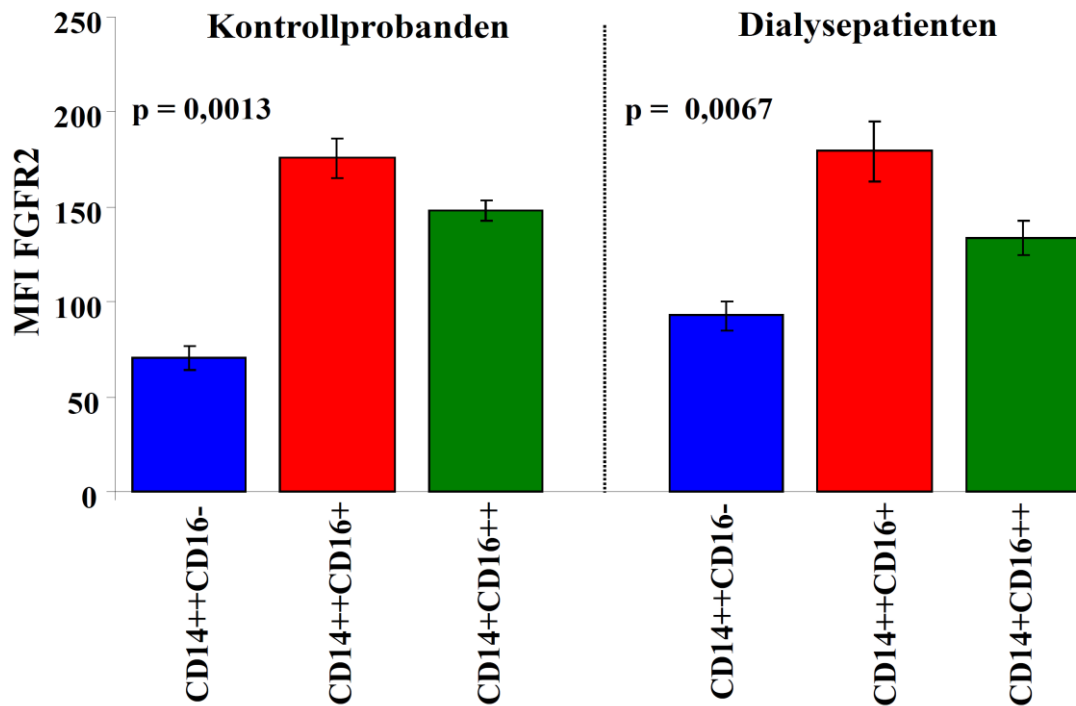


Abbildung 15: Expression des FGFR2 Rezeptors auf den drei Monozytensubpopulationen bei gesunden Kontrollprobanden (n = 6) und bei Dialysepatienten (n = 6). Statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunns Post-hoc Test.

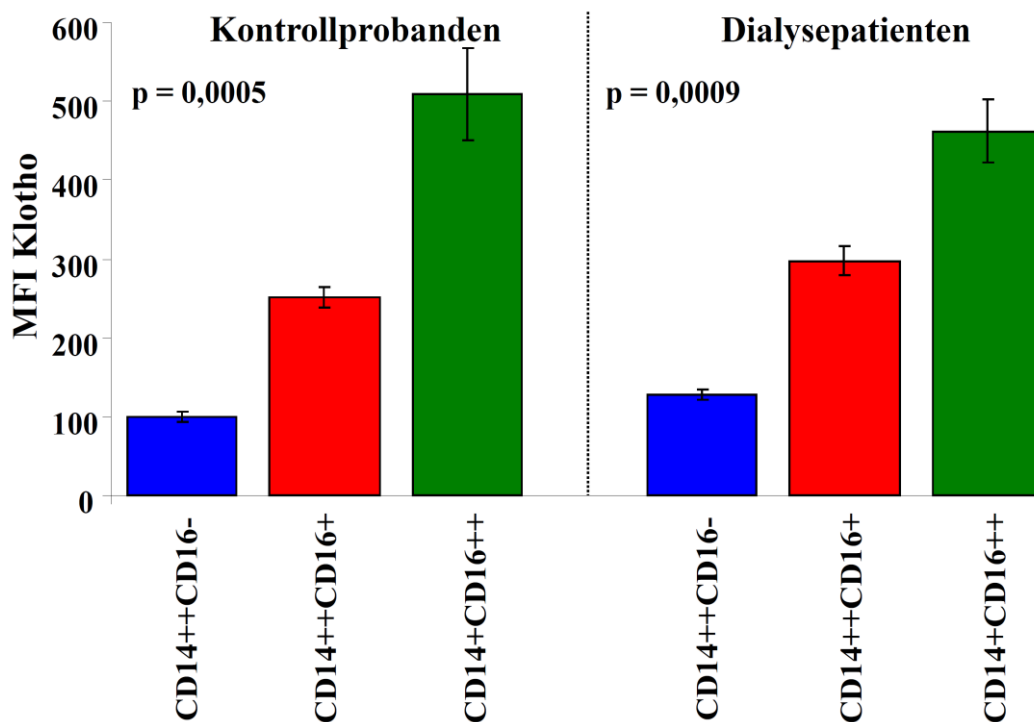


Abbildung 16: Expression von membranständigem Klotho auf den drei Monozytensubpopulationen bei gesunden Kontrollprobanden (n = 6) und bei Dialysepatienten (n = 6). Statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunns Post-hoc Test.

7.3 VERSUCHSREIHE VOLLBLUTSTIMULATION

7.3.1 Vollblutstimulation mit rekombinantem FGF23 aus HEK

293 Zellen

Eine Stimulation der Zellen mit rekombinantem FGF23 aus HEK 293 Zellen verminderte die Zellzahl der intermediären und nicht-klassischen Monozyten drastisch (Abbildung 17) und führte gleichzeitig zu einer deutlichen Aktivierung der klassischen und intermediären Monozyten mit signifikantem Anstieg der CD86 Expression (Abbildung 18).

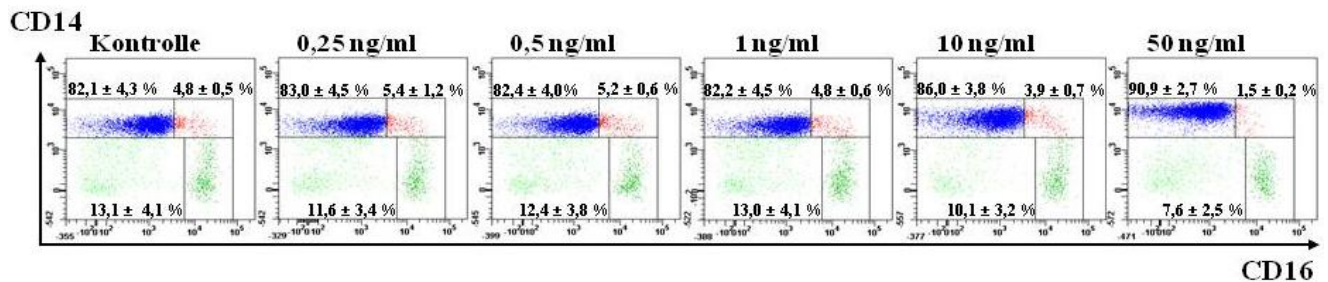


Abbildung 17: Anzahl der Monozytensubpopulationen (Mittelwert und Standardfehler) nach 5 h Stimulation mit rekombinanten FGF23 aus HEK 293 Zellen. Dargestellt sind ein repräsentatives Beispiel sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen aller 5 Versuche. Statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunns Post-hoc Test: CD14⁺⁺CD16⁻ p = 0,4325; CD14⁺⁺CD16⁺ p = 0,0118 *; CD14⁺CD16⁺⁺ p = 0,6988)

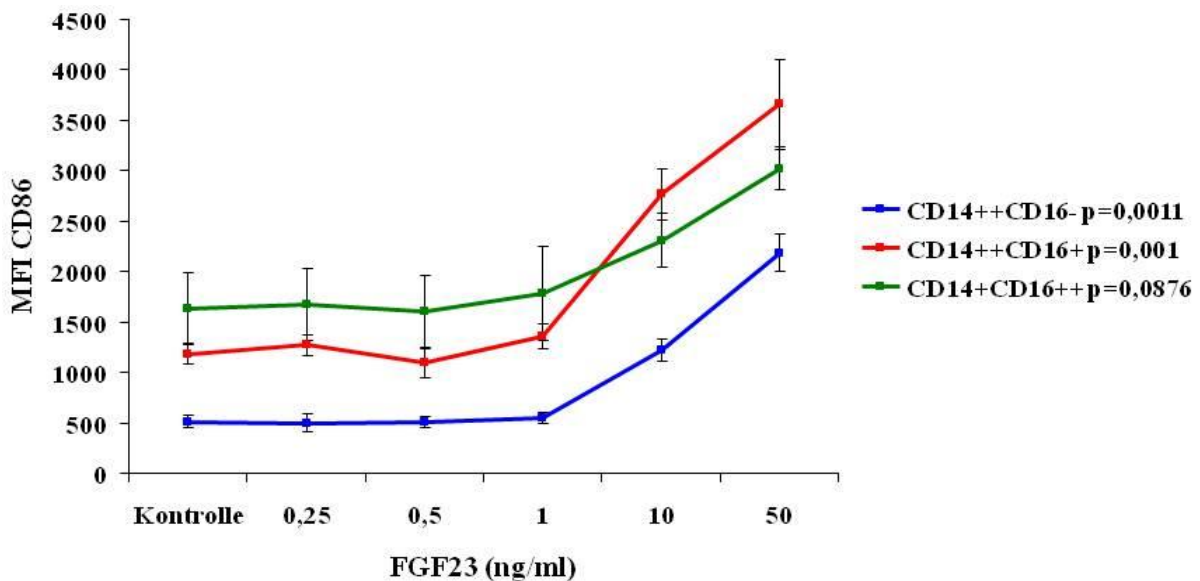


Abbildung 18: CD86 Expression von Monozytensubpopulationen nach 5 Stunden Stimulation mit rekombinantem FGF23 aus HEK 293 Zellen (MFI: Mittlerer

Fluoreszenzintensität). Statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunns Post-hoc Test.

7.3.2 Vollblutstimulation mit LPS

Das beobachtete Aktivierungsmuster der FGF23 stimulierten Monozyten erinnerte an frühere Versuche aus dem Labor mit Stimulanzien, die mit LPS kontaminiert waren. Monozyten reagieren sehr sensitiv auf kleinste Verunreinigungen und werden dadurch aktiviert.

Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht wie Monozyten auf eine LPS Stimulation reagieren. Dabei zeigte eine Stimulation mit LPS ein vergleichbares Aktivierungsmuster wie die Stimulation mit FGF23 aus HEK 293 Zellen (Abbildung 19 und 20).

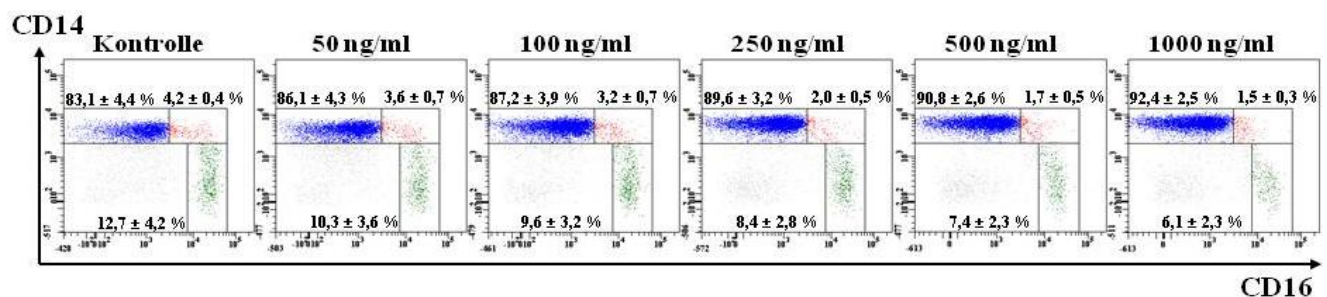


Abbildung 19: Anzahl der Monozytensubpopulationen (Mittelwert und Standardfehler) nach 5 h Stimulation mit LPS. Dargestellt sind ein repräsentatives Beispiel sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen aller 5 Versuche. Statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunns Post-hoc Test: CD14++CD16- $p = 0,2526$; CD14++CD16+ $p = 0,0091^{**}$; CD14+CD16++ $p = 0,6575$

Ergebnisse

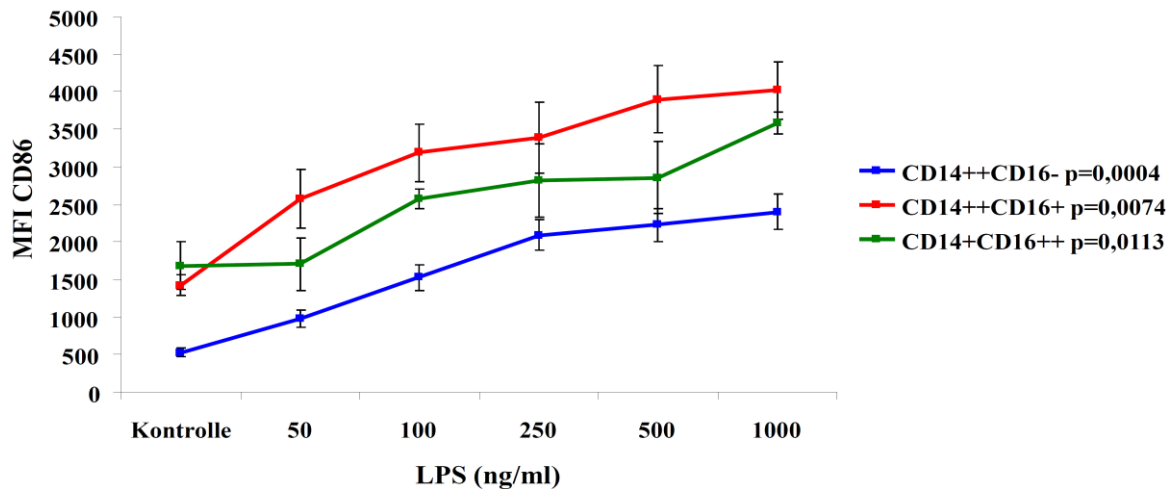


Abbildung 20: CD86 Expression der Monozytensubpopulationen nach 5 h Stimulation mit LPS. (MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität). Statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunns Post-hoc Test.

7.3.3 Vollblutstimulation mit rekombinantem FGF23 aus NS0

Zellen

Um zu untersuchen ob die beobachteten Effekte durch FGF23 Stimulation auf eine potentielle Kontamination zurückzuführen sind, wurden die Versuche mit einem weiteren FGF23 durchgeführt (FGF23 aus NS0 Zellen).

Mit diesem Reagenz wurde keine Monozytenaktivierung induziert. Es haben sich weder die Anzahl der Monozytensubpopulationen (Abbildung 21) noch die CD86 Expression (Abbildung 22) verändert.

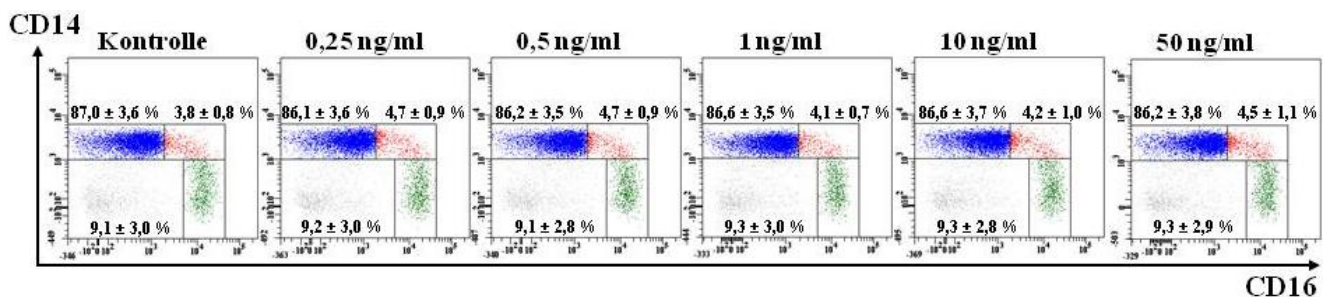


Abbildung 21: Anzahl der Monozytensubpopulationen (Mittelwert und Standardfehler) nach 5 h Stimulation mit rekombinanten FGF23 aus NS0 Zellen. Dargestellt sind ein repräsentatives Beispiel sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen aller 5 Versuche. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunns Post-hoc Test: CD14++CD16- p = 0,9821; CD14++CD16+ p = 0,8432; CD14+CD16++ p = 0,9956.

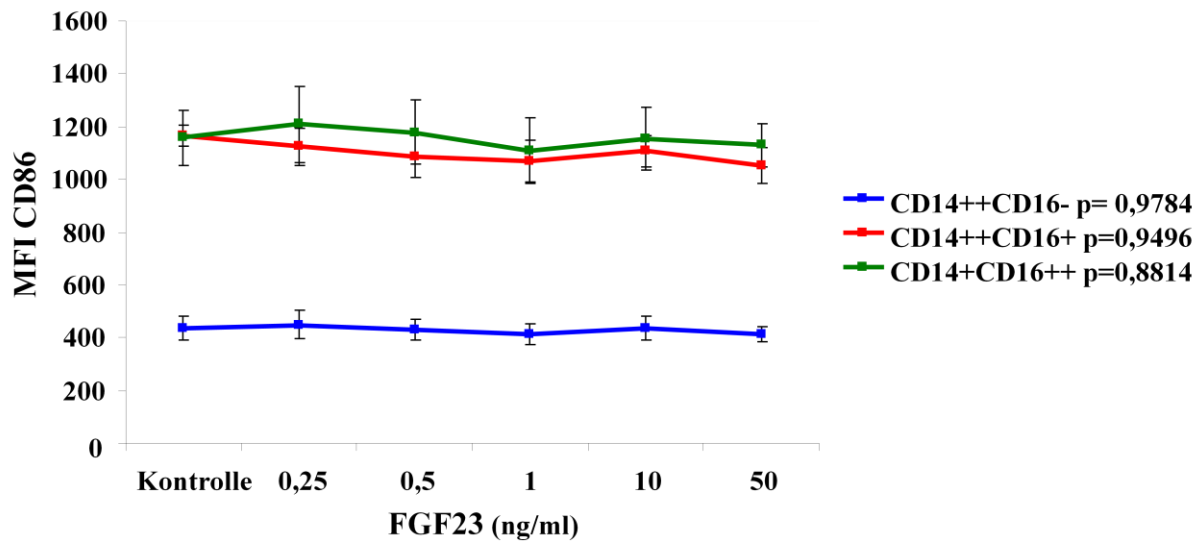


Abbildung 22: CD86 Expression der Monozytensubpopulationen nach 5 h Stimulation mit FGF23 aus NS0 Zellen MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunns Post-hoc Test.

Für alle weiteren Versuche mit FGF23 wurde FGF23 aus NS0 Zellen verwendet.

7.3.4 Analyse von Oberflächenrezeptoren nach FGF23

Stimulation

Da somit weder eine direkte Aktivierung der Monozyten noch eine Änderung der Zellzahl der Monozytensubpopulationen aufgezeigt werden konnte, sollte nun untersucht werden, ob FGF23 sich auf andere Monozyteneigenschaften auswirkt.

Die Oberflächenrezeptoren CCR5 und CX₃CR1 spielen bei der Migration von Monozyten in die Gefäßwand eine zentrale Rolle. Eine Änderung in ihrer Expressionsrate durch FGF23 wurde nach fünfstündiger Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen (Kontrolle, 0,5 ng/ml und 10 ng/ml FGF23) geprüft. Dargestellt ist die Expression von CCR5 (Abbildung 23) und CX₃CR1 (Abbildung 24). Im Einklang mit der Literatur konnte zunächst gezeigt werden, dass innerhalb der Monozytensubpopulationen intermediäre Monozyten CCR5 am stärksten exprimieren. CX₃CR1 wird dagegen am stärksten von nicht-klassischen Monozyten exprimiert. Klassische Monozyten exprimieren beide Rezeptoren nur in geringem Maße. Die

Stimulation der Monozyten mit FGF23 bewirkte jedoch keine Änderung der Expressionsrate der Rezeptoren auf den Monozytensubpopulationen.

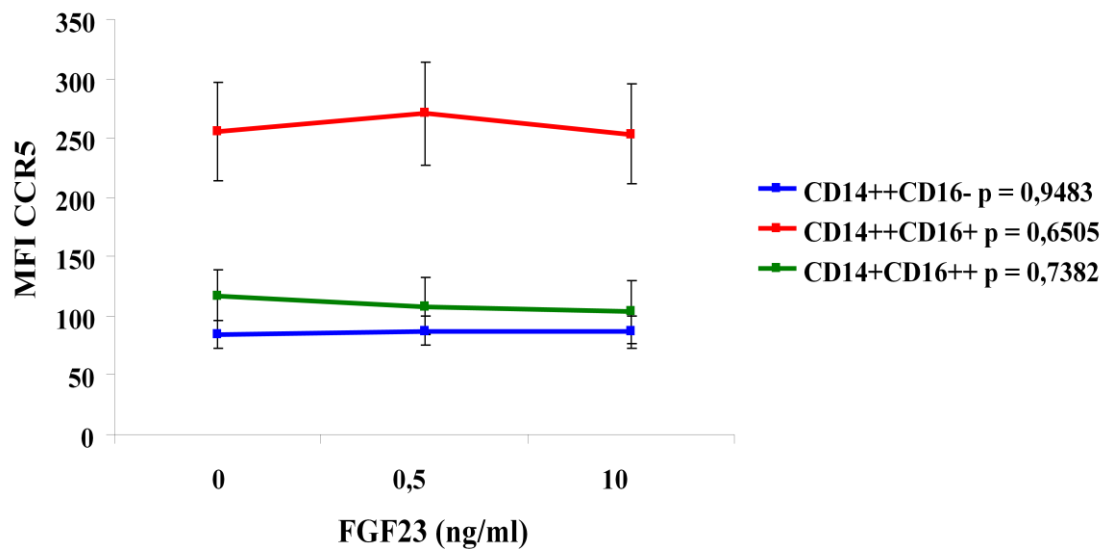


Abbildung 23: CCR5 Expression auf den Monozytensubpopulationen nach 5 h Stimulation mit FGF23. Die p-Werte sind in der Legende aufgelistet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunns Post-hoc Test.

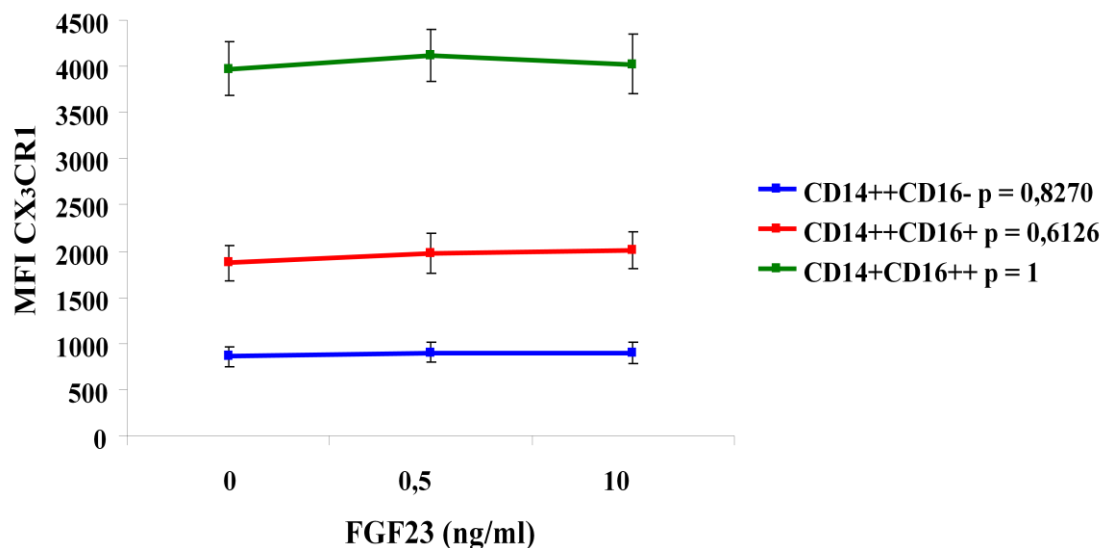


Abbildung 24: CX₃CR1 Expression auf den Monozytensubpopulationen nach 5 h Stimulation mit FGF23 (MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunns Post-hoc Test.

7.3.5 Phagozytosekapazität klassischer Monozyten

Die Phagozytose von Mikroorganismen ist eine bedeutende Eigenschaft von Antigen präsentierenden Zellen wie den Monozyten. Klassische Monozyten haben dabei die höchste Kapazität zur Phagozytose unter den Monozytensubpopulationen [10]. Diese Aussage konnte in der vorliegenden Promotionsarbeit zunächst bestätigt werden (nicht gezeigt). Eine fünfstündige FGF23 Stimulation führte jedoch zu keinerlei Veränderung der Phagozytoserate (Abbildung 25).

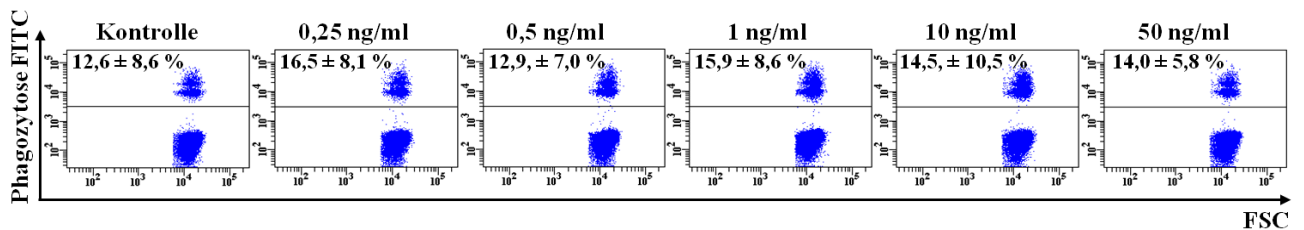


Abbildung 25: Phagozytoserate CD14++CD16- Monozyten. Dargestellt sind ein repräsentatives Beispiel und die Mittelwert und Standardfehler der phagozytierenden Monozyten (FITC positive Zellen oberhalb der Horizontallinie) aller 5 Versuche. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunns Post-hoc Test: $p = 0,9548$.

7.3.6 Induktion der T-Zellproliferation

T-Zellen werden durch die Bindung des T-Zell-Rezeptors an den MHCII Komplexen auf Monozyten aktiviert und zur Proliferation angeregt. Daher sollte untersucht werden, ob FGF23 eine Auswirkung auf die T-Zell-Proliferation hat. Hierfür wurden PBMCs für vier Tage mit FGF23 inkubiert, während ihre Proliferation durch das *Staphylococcus* Enterotoxin B (SEB) angeregt wurde. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Monozyten induzierten Proliferation der T- Zellen nach einer FGF23 Stimulation festgestellt werden (Abbildung 26).

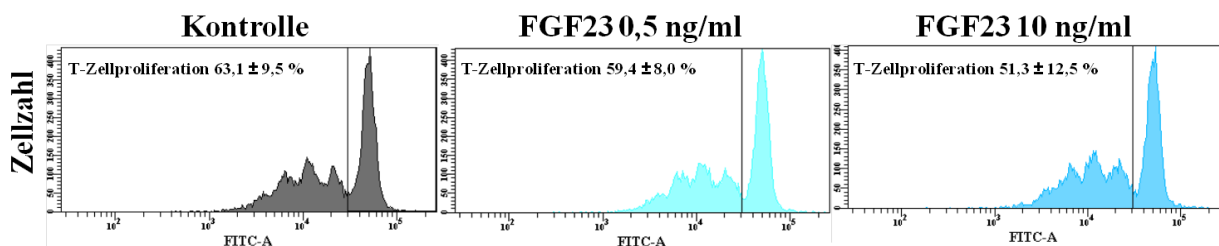


Abbildung 26: Induktion der T-Zellproliferation an Tag 4 der Stimulation durch Monozyten; Dargestellt sind ein repräsentatives Beispiel und die Mittelwert und Standardfehler der proliferierenden T-Zellen (Zellen linksseitig der Vertikallinie) aller 3 Versuche. Die

statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunns Post-hoc Test: $p = 0,5611$

7.3.7 ROS Bildung ausdifferenzierter Monozyten

Der Begriff „Reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS) ist ein Sammelbegriff für freie Radikale und Nicht-Sauerstoffradikale. Sie entstehen in den Mitochondrien als Nebenprodukt der Atmungskette und werden von den Zellen des Immunsystems zur Abtötung von Mikroorganismen genutzt. Sie wurden hier als Teil der funktionellen Eigenschaften der Monozyten untersucht. Die durchflusszytometrische Messung der reaktiven Sauerstoffspezies erfolgte mit Hilfe des ROS-Nachweisreagenz H2DFFDA, das in die Zellen diffundierte und dort durch ROS zu einem fluoreszierenden Produkt wurde. Es ließen sich zwar leichte Veränderungen in der ROS-Produktion nach FGF23 Stimulation feststellen, sie erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau (Abbildung 27).

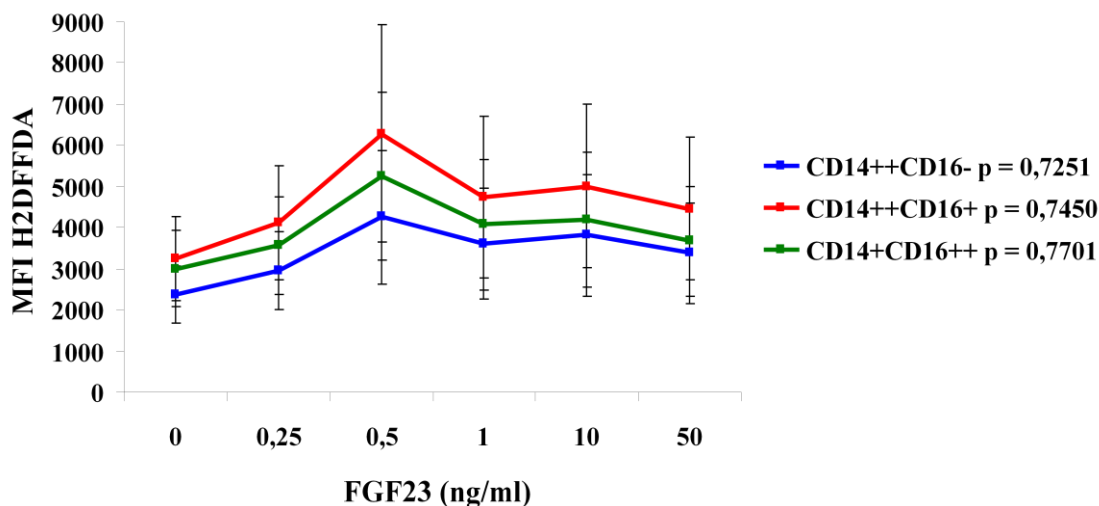


Abbildung 27: ROS Produktion der Monozytensubpopulationen nach fünfstündiger Stimulation mit FGF23 (MFI: mittlere Fluoreszenzintensität). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunns Post-hoc Test.

7.4 VERSUCHSREIHE STAMMZELLVERSUCHE

In den bisherigen Versuchen war kein Effekt von FGF23 nach fünfstündiger Stimulation von ausdifferenzierten Monozyten festgestellt worden. Abschließend sollte geklärt werden, ob ein Effekt bei hämatopoetischen Stammzellen, die zu Monozyten differenziert werden, auftritt. Dies wäre dann ein Effekt durch eine mehrtägige Stimulation mit FGF23.

7.4.1 Isolation von hämatopoetischen Stammzellen

Hämatopoetische Stammzellen wurden aus Vollblut gesunder Spender mithilfe des selektiv exprimierten Oberflächenproteins CD34 gewonnen. Die Reinheit der gewonnen Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft (Abbildung 28).

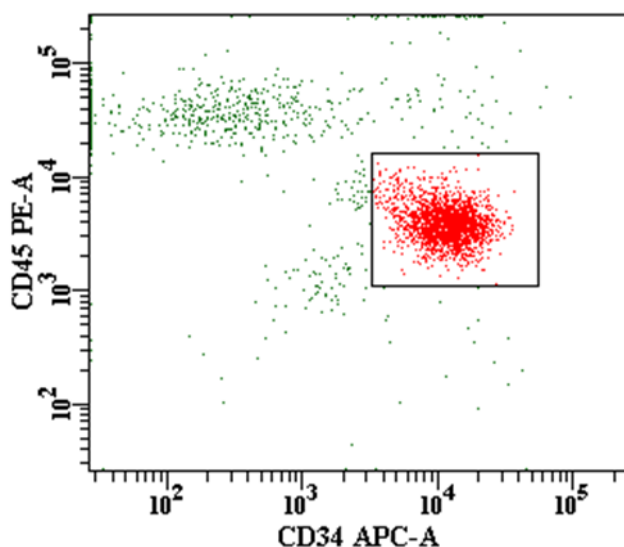


Abbildung 28: Überprüfung der Reinheit gewonnener hämatopoetischer Stammzellen mithilfe von CD45 und CD34. Im repräsentativen Beispiel wurde eine Reinheit von 69,5 % erzielt (Zellen innerhalb des definierten Kastens).

7.4.2 Expansion hämatopoetischer Stammzellen

Durch die Aufreinigung der hämatopoetischen Stammzellzellen konnten durchschnittlich 305.000 ± 47.434 Zellen aus 54 ml EDTA Vollblut gewonnen werden. Um eine ausreichende Anzahl an Zellen für anschließende Stimulation zu erhalten, wurden die Zellen 14 Tage in Hematopoetic Progenitor Expansion Medium DXF unter Zugabe der Wachstumsfaktoren TPO, SCF, FLT-3L und IL-3 auf ein Vielfaches expandiert. In Abbildung 29 ist die Zellexpansion festgehalten.

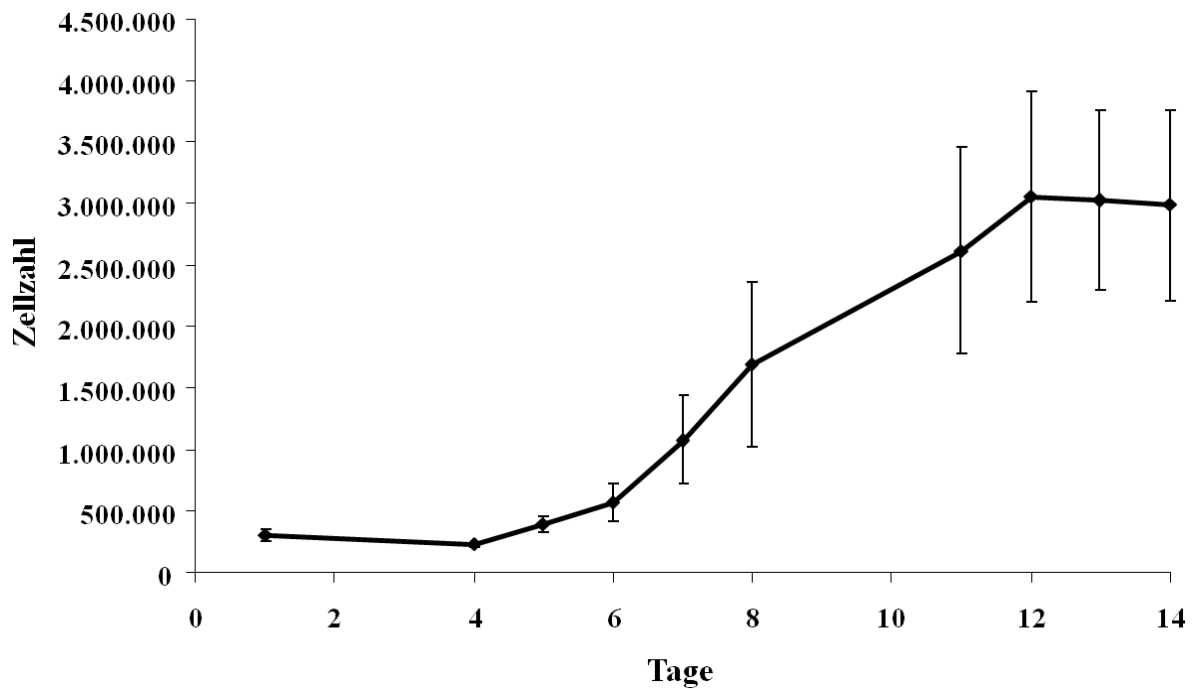


Abbildung 29: Expansion der hämatopoetischen Stammzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler aus 6 unabhängigen Versuchen.

7.4.3 Expression von FGF Rezeptoren und Klotho auf der Oberfläche von hämatopoetischen Stammzellen

Dass FGF23 hämatopoetische Stammzellen überhaupt beeinflussen kann, wurde mit dem Vorhandensein der FGFR1, FGFR2 und des Klothorezeptors bestätigt (Abbildung 30).

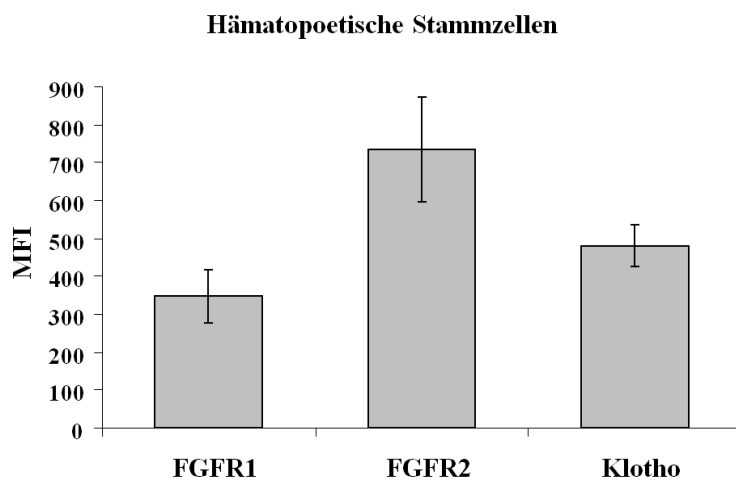


Abbildung 30: Durchflusszytometrische Bestimmung der Rezeptoren FGFR1, FGFR2 und Klotho (MFI: mittleren Fluoreszenzintensität).

7.4.4 Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu Monozytensubpopulationen

Die expandierten hämatopoetischen Stammzellen wurden in Hematopoietic Progenitor Medium zu Monozyten differenziert und deren Differenzierung über einen Zeitraum von 8 Tagen verfolgt. Die Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen zu klassischen und intermediären Monozyten wurde per Durchflusszytometrie festgehalten (Abbildung 31).

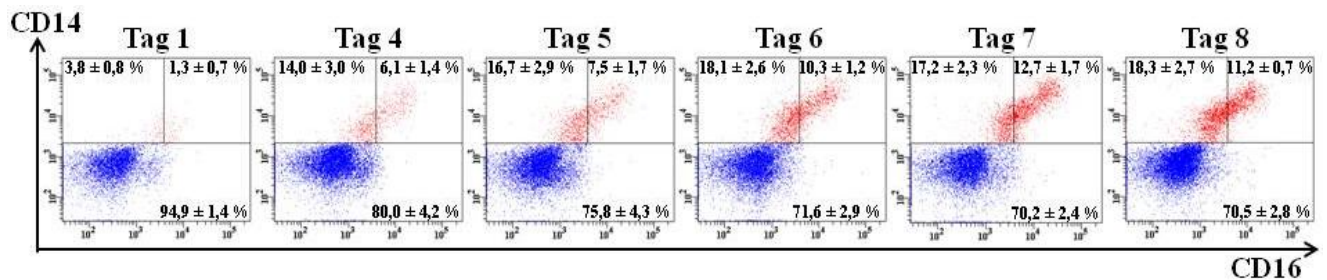


Abbildung 31: Entwicklung der hämatopoetischen Stammzellen (blaue Punktwolke) zu klassischen (jeweils oben links zu sehen) und intermediären Monozyten (oben rechts) in der Zellkultur. Darstellt sind ein repräsentatives Beispiel (Mittelwert und Standardfehler) aller sechs Einzelversuche.

Die hämatopoetischen Stammzellen differenzierten sich zu Monozyten, welche sich nach 12 Tagen begannen weiter zu Dendritischen Zellen zu differenzieren (Abbildung 32).



Abbildung 32: Dargestellt ist eine lichtmikroskopische Aufnahme einer dendritischen Zelle (durch ← markiert) und zweier Monozyten.

7.4.5 Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu Monozyten unter FGF23 Stimulation

In diesem Modell wurde die Wirkung von FGF23 auf die Differenzierung der CD34-positiven Zellen zu intermediären Monozyten untersucht. Den hämatopoetischen Stammzellen wurde hierzu FGF23 in aufsteigenden Konzentrationen zum Differenzierungsmedium hinzugegeben. Es zeigte sich eine leichte Zunahme der intermediären Monozyten unter 0,5 ng/ml und 10 ng/ml FGF23 Stimulation, während die Stimulation mit 100 ng/ml FGF23 die Differenzierung eher inhibierte (Abbildung 33). Keine Veränderung der Differenzierung der Monozyten durch die FGF23 Stimulation erreichte das Signifikanzniveau.

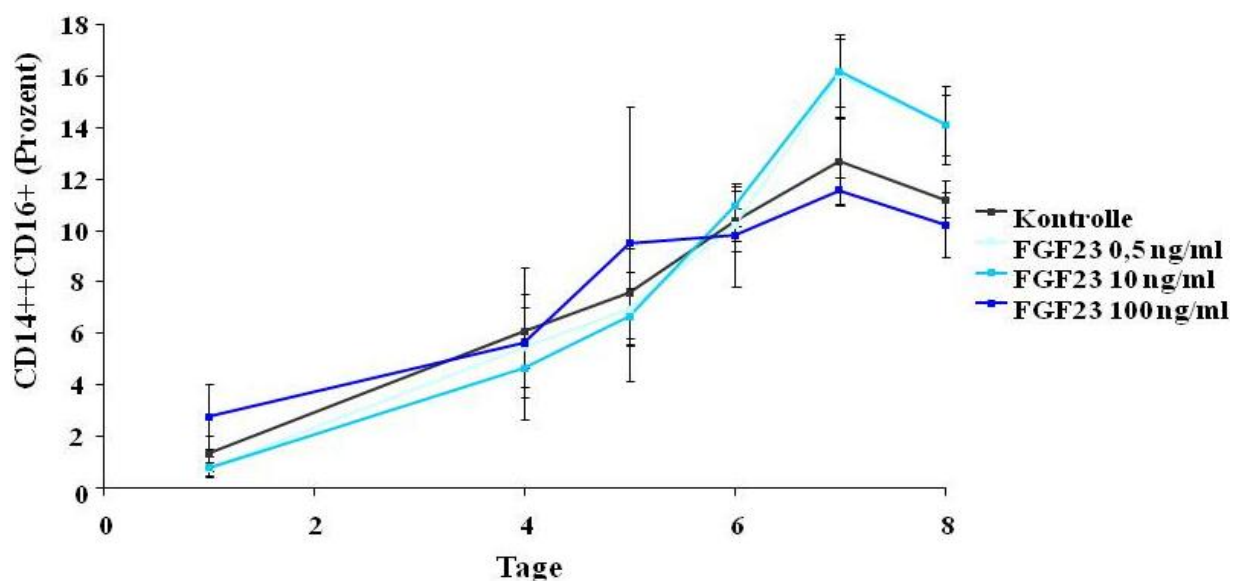


Abbildung 33: Dargestellt sind die Prozentzahlen der intermediären Monozyten an den Tagen der Messungen. An Tag 8 der Differenzierung wurde die unterschiedlich starke Differenzierung unter FGF23 Einfluss überprüft. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunns Post-hoc Test: $p = 0,1225$.

7.4.6 Expression von Oberflächenrezeptoren differenzierter Monozyten

Die differenzierten Monozyten wurden auf die charakteristischen Marker CCR5 und CX₃CR1 hin untersucht. Hierbei zeigte sich, dass CD14-CD16- diese Chemokinrezeptoren kaum exprimierten, während beiden von klassischen Monozyten und - noch ausgeprägter – von intermediären Monozyten exprimiert werden. FGF23 beeinflusste weder die Stärke der Expression von CCR5 (Abbildung 34), noch von CX₃CR1 (Abbildung 35).

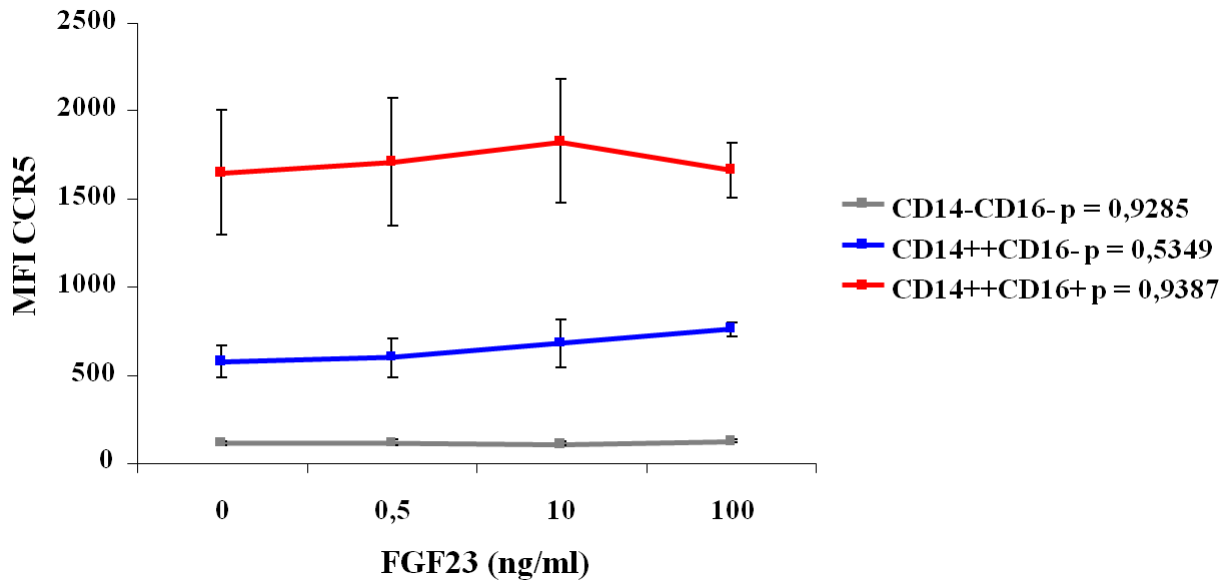


Abbildung 34: Expression des Oberflächenrezeptors CCR5 auf differenzierten Monozyten (MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunns Post-hoc Test.

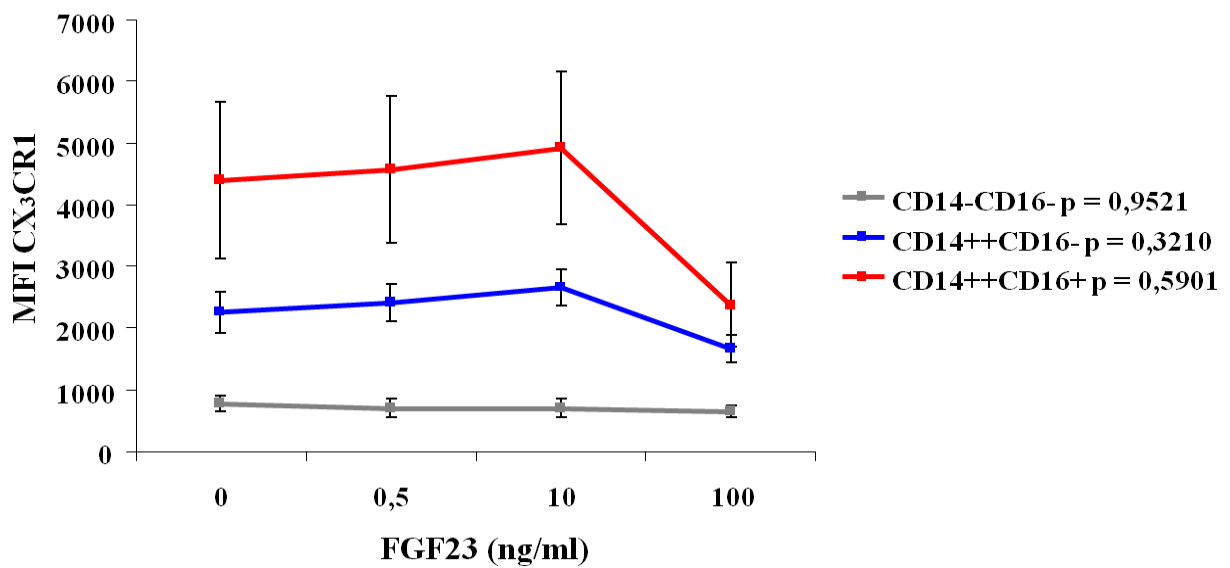


Abbildung 35: Expression des Oberflächenrezeptors CX₃CR1 auf den differenzierten Monozyten (MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität). Statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunns Post-hoc Test.

7.4.7 Phagozytosekapazität differenzierter intermediärer

Monozyten

Die differenzierten Monozyten wurden auf ihre Fähigkeit zur Phagozytose hin untersucht. Anders als bei den Monozyten aus dem Vollblut, wiesen bei den differenzierten Monozyten die intermediären Monozyten die höchste Fähigkeit zur Phagozytose auf. Jedoch unterschieden sich die FGF23 stimulierten Monozyten nicht von unstimulierten Monozyten (Abbildung 36).

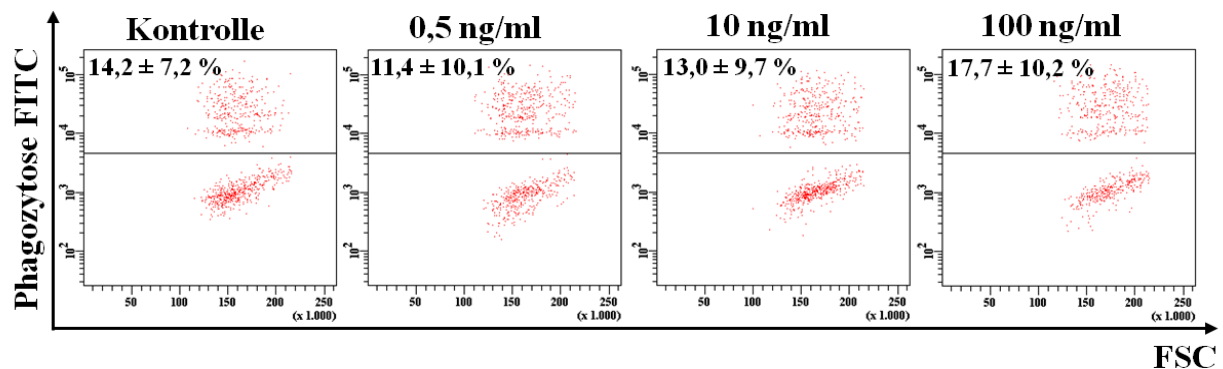


Abbildung 36: Phagozytoserate intermediärer Monozyten am 8. Tag der Differenzierung. Dargestellt sind ein repräsentatives Beispiel, und Mittelwert und Standardfehler der phagozytierenden Monozyten (FITC positive Zellen oberhalb der Horizontallinie) aus 5 Einzelstudien. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunns Post-hoc Test: $p = 0,9718$

7.4.8 ROS Produktion differenzierter Monozyten

Die differenzierten Monozyten wurden schließlich auf die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies hin untersucht. Die intermediären Monozyten hatten auch hier eine deutlich höhere ROS Produktion als die klassischen Monozyten (siehe Abbildung 37). FGF23 Stimulation beeinflusste die ROS Produktion nicht.

Ergebnisse

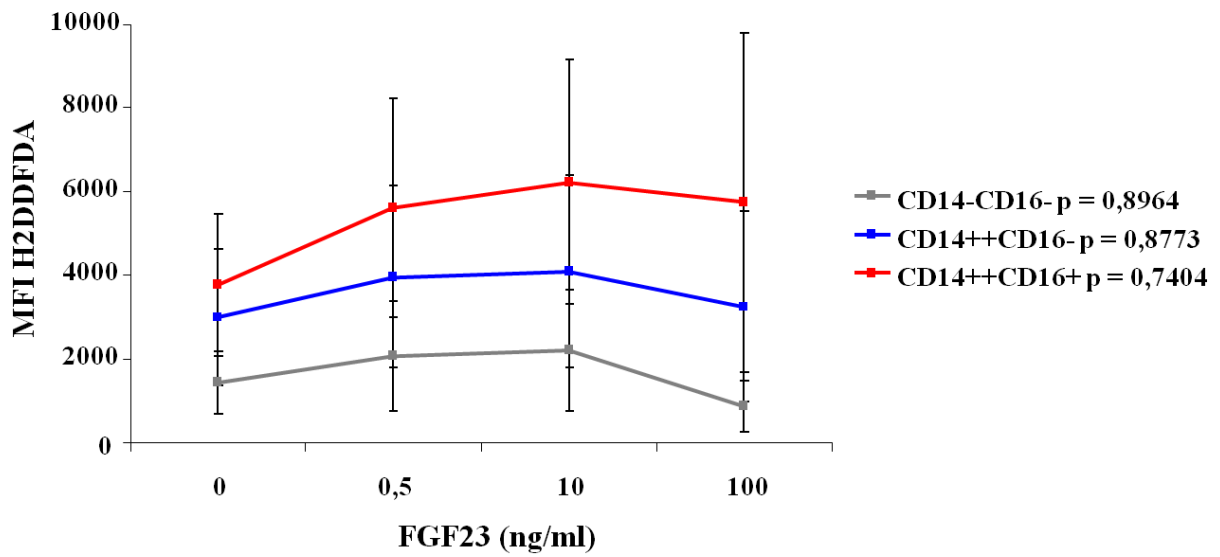


Abbildung 37: ROS Produktion der Monozytensubpopulationen nach Stimulation mit FGF23 (MFI: mittlere Fluoreszenzintensität). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 5 Einzelstudien. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Dunns Post-hoc Test.

8. Diskussion

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe identifizierten die Zellzahlen der intermediären Monozyten, nicht jedoch die Zellzahlen anderer Monozytensubpopulationen, als unabhängige Prädiktoren für kardiovaskuläre Ereignisse sowohl bei Dialysepatienten [27] als auch bei Patienten mit früheren Stadien der chronischen Nierenerkrankung („chronic kidney disease“; CKD) [59]. Gleichzeitig sind bereits vor Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz („end stage renal disease“; ESRD) die Zellzahlen der intermediären Monozyten deutlich erhöht [27]. Daher werden intermediäre Monozyten als mögliche Zielzellen für neue Ansätze in Prävention und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen bei CKD diskutiert [21, 40]. Es erscheint somit bedeutsam, diejenigen Pathomechanismen zu identifizieren, die bei CKD für die Entstehung von intermediären Monozyten verantwortlich sind, um schließlich pharmakologische Strategien zur Reduktion der intermediären Monozyten zu definieren.

Rezente klinische und pathophysiologische Arbeiten postulieren einen direkten Einfluss des Calcium-Phosphat-Metabolismus auf das Immunsystem nierenkranker Menschen [1, 4, 49, 51, 75]. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, wie sich das phosphaturische Hormon FGF23 auf die Verteilung der Monozytensubpopulationen auswirkt und ob FGF23 zur Monozytendysfunktion bei chronisch nierenkranken Menschen beiträgt [34].

8.1 Urämischer Immundefekt

Patienten mit chronischer Nierenerkrankung haben gegenüber Nierengesunden eine massiv erhöhte extrarenale Morbidität und Mortalität, welche vor allem auf eine erhöhte Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen [29] und Infektionen [8] zurückgeführt werden kann.

Eine zentrale Bedeutung in der Entstehung beider Krankheitsentitäten hat der „urämische Immundefekt“ chronisch nierenkranker Menschen, da das Immunsystem einerseits zur Kontrolle von Infektionserkrankungen unabdingbar ist, andererseits aber auch an der Entstehung von atherosklerotischen Gefäßerkrankungen, als quantitativ bedeutsamste kardiovaskuläre Erkrankungen, von zentraler pathophysiologischer Bedeutung ist [25, 41].

Dabei ist das Immunsystem in zweierlei Hinsicht betroffen. Immunantworten auf Infekte sind bei der Urämie häufig inadäquat; und übermäßig aktivierte Leukozyten unterhalten einen chronischen Entzündungsprozess, der wiederum kardiovaskuläre Erkrankungen begünstigt [8, 35]. Einen erheblichen Anteil daran haben Monozyten, die in ihrer Funktion bei chronisch nierenkranken Menschen gestört sind und ihren klassischen Funktionen nicht adäquat nachkommen können. So reagieren Monozyten bei CKD Patienten hyporeaktiv auf LPS Stimulationen, haben eine verringerte Endozytose [35], produzieren jedoch vermehrt proinflammatorische Zytokine wie Il-6 und TNF α [73]. Zudem ist eine ihrer wichtigsten Funktionen, die Fähigkeit zur Phagozytose, reduziert [35]. Auch die Expression von CD86, einem bedeutenden Oberflächenmolekül zur T-Zell Interaktion, ist vermindert [20]. Somit betrifft der urämische Immundefekt nicht nur das angeborene, sondern auch das erworbene Immunsystem. Eine Folge der konsekutiv veränderten T-Lymphozytenfunktion ist das hohe Impfversagen etwa gegen Hepatitis B, Influenza, Clostridium tetani, oder Corynebacterium diphtheriae [14]. Die reduzierten Zellfunktionen bei gleichzeitig proinflammatorischem Milieu führen zu einem circulus vitiosus aus Immundefekt und chronischer Mikroinflammation.

8.2 Monozytenheterogenität bei Urämie

Laut der Klassifikation des Nomenclature Committee of the International Union of Immunological Societies werden drei Subpopulationen von Monozyten differenziert [80]. Bei dem urämischen Immundefekt ist nicht nur die Funktion der Monozyten gestört, sondern auch das Verhältnis zwischen den Monozytensubpopulationen [27, 58]. So ist die Anzahl sowohl der intermediären als auch der nicht-klassischen Monozyten bei Dialysepatienten deutlich erhöht [28, 50, 58, 59].

Untersuchungen in der Allgemeinbevölkerung als auch bei chronisch nierenkranken Menschen suggerieren, dass intermediäre Monozyten besondere proinflammatorische Charakteristika aufweisen, etwa aufgrund einer erhöhten Produktion an ROS [79] und an Osteoactivin [53], aber auch durch die subpopulationsspezifische Hochregulation von zentralen Chemokinrezeptoren [45], Adhäsionsmolekülen und eines spezifischen Expressionsmusters von Zytokine, wobei proinflammatorische Zytokine überexprimiert und das antiinflammatorische Zytokin IL-10 mindereexprimiert wird [73].

In Einklang mit diesem proinflammatorischen Charakter ist die Anzahl der intermediären Monozyten und nicht die Gesamtzahl der Monozyten Prädiktor kardiovaskulärer Ereignisse bei chronisch nierenkranken Menschen [27, 59]. Allerdings ist der pathophysiologische Hintergrund, warum es zum Shift der Monozytensubpopulationen bei Urämie hin zu einer höheren Anzahl an intermediären Monozyten kommt, bislang unklar.

Bei der Urämie kommt es aufgrund der verminderten exokrinen Nierenfunktion und der verminderten renalen Metabolisierung zu einer Akkumulation zahlreicher Substanzen. Maßgeblich betroffen davon ist auch der Calcium-Phosphat-Haushalt; so droht mit progredienter Einschränkung der Nierenfunktion eine Hyperphosphatämie. Als vermeintlich protektiven Schutzmechanismen, welcher auch bei verminderter glomerulärer Filtrationsrate eine adäquate Phosphatausscheidung gewährleisten soll, gilt die Freisetzung des phosphaturischen Hormon FGF23 bei progredienter Einschränkung der exokrinen Nierenfunktion. So weisen Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung im Stadium G 4 (glomeruläre Filtrationsrate 29,9 – 15,0 ml/min/1,73 m²) gegenüber Nierengesunden Menschen mehr als zehnfach erhöhte FGF23 Plasmaspiegel auf, wodurch die Plasma-Phosphatspiegel bis kurz vor Erreichen der ESRD bei den meisten betroffenen Menschen im Normbereich gehalten werden können [77].

Allerdings wurden in den letzten Jahren mögliche schädliche pathophysiologische Folgen einer FGF23 Überexpression erkannt, welche neben möglichen kardiotoxischen Effekten [15] eine Steigerung inflammatorischer Prozesse umfassen könnte, da FGF23 unabhängig mit inflammatorischen Markern bei CKD Patienten assoziiert ist [49]. Zudem konnten erste Forschungsergebnisse einen Effekt von FGF23 auf Monozyten nachweisen [4, 75]; so wurde einerseits gezeigt, dass Monozyten nach FGF23 Stimulation eine deutlich geringere Expression von CYP27B1, dem Schlüsselenzym der Synthese von 1,25 (OH)₂ Cholecalciferol („aktives Vitamin D“) aufweisen [75] und andererseits, dass die extrarenale Synthese von aktivem Vitamin D in Monozyten durch FGF23 inhibiert wird [4]. Diese Untersuchungen fokussierten somit jedoch auf die Auswirkungen von FGF23 auf den Vitamin D-Stoffwechsel in Monozyten, während anderen Aspekte der Monozytendysfunktion nicht untersucht wurden.

Vor diesem Hintergrund sollte überprüft werden, inwieweit der massive Anstieg von FGF23 bei chronisch nierenkranken Menschen zur Monozytendysfunktion bei CKD Patienten beitragen könnte.

8.3 FGF23 als Prädiktor intermediärer Monozyten

Zunächst sollte in der vorgelegten Dissertationsarbeit die Assoziation zwischen FGF23 und Monozytensubpopulationen epidemiologisch analysiert werden. Hierzu erfolgten eine retrospektive Auswertung der HOM sweet HOME Studie, welche 951 Patienten vor elektiver Koronarangiographie untersuchte.

Dabei konnte FGF23 zunächst in univariater Analyse als signifikanter Prädiktor der Anzahl der intermediären Monozyten identifiziert werden.

Im multivariaten Regressionsmodell war nach Adjustierung für die klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren und für die glomeruläre Filtrationsrate FGF23 diejenige Komponente des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels, die am stärksten mit der Anzahl der intermediären Monozyten korrelierte.

Da die meisten Patienten der HOM sweet HOME Studie jedoch eine normale Nierenfunktion aufwiesen und daher die Plasma FGF23 Spiegel bei den meisten Studienteilnehmern im physiologischen oder allenfalls diskret erhöhten Bereich lagen, resultierte die Frage, inwiefern die Ergebnisse der HOM sweet HOME Studie auch für Menschen mit eingeschränkter Nierenfunktion – und konsekutiv zumeist deutlich erhöhten Plasma FGF23 Spiegeln – zutreffen.

Zur Beantwortung dieser Frage initiierten wir eine klinische Studie an Dialysepatienten, welche die zuvor gewonnen Ergebnisse von den zumeist nierengesunden HOM sweet HOME Studienteilnehmern nur bedingt bestätigen konnte. Zwar zeigte sich ein tendenzieller Zusammenhang zwischen höheren FGF23 Werten und einer erhöhten Anzahl an intermediären Monozyten, doch erreichten die Ergebnisse nicht das vordefinierte Signifikanzniveau.

Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse liefert zunächst ein Vergleich des jeweiligen Studienaufbaus. Die deutlich geringere Probandenzahl bei der Dialysestudie mit 46 Patienten im Gegensatz zu 951 untersuchten Patienten bei der HOM sweet HOME Studie reduziert massiv die Power, da nach Stratifizierung der Patienten anhand des Plasma-FGF23 keine signifikanten Unterschiede der Monozytenzahlen zu erkennen waren. Weiterhin wies das Kollektiv der Dialysepatienten deutliche Heterogenitäten auf: So waren zwar alle Patienten hämodialysepflichtig, zeigten doch große Unterschiede in Nierengrunderkrankung, residualer renaler Funktion und in der Komorbidität auf.

8.4 Experimentelle Untersuchungen zu FGF23 als Immunmodulator

Nachdem epidemiologische Arbeiten immer nur Assoziationen, jedoch niemals Kausalitäten aufzeigen können, wurden in dieser Dissertation parallel zu den epidemiologischen Untersuchungen auch experimentelle Analysen durchgeführt, um direkte Effekte von FGF23 auf die Verteilung der Monozytensubpopulationen zu ermitteln.

Zunächst sollte die Expression von Zielrezeptoren von FGF23 auf Monozyten subpopulationsspezifisch untersucht werden. Die endokrine Wirkung von FGF23 wird über FGF Rezeptoren vermittelt, von denen bis heute FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 bekannt sind. Die genauen (patho)physiologischen Unterschiede zwischen den FGF Rezeptoren sind bis dato jedoch noch nicht aufgeschlüsselt.

FGFR1, FGFR3 und FGFR4 werden erst im Falle einer Ko-Expression mit dem transmembranen Korezeptor α -Klotho zum spezifischen Rezeptor für FGF23 [74], da FGF23 eine geringe Affinität zu den FGF Rezeptoren oder zu α -Klotho alleine hat und nur zu dem FGFR-Klotho-Komplex eine hohe Affinität aufweist [31]. Dies ermöglicht trotz ubiquitärer Expression von FGF23 Rezeptoren, dank selektiver Expression von α -Klotho in Niere, Nebenschilddrüsen und dem Plexus Corioideus eine organspezifische Wirkung von FGF23.

Allerdings wird postuliert, dass im Falle einer Akkumulation, wie etwa bei der chronischen Nierenerkrankung, FGF23 pathophysiologisch außerhalb seiner physiologischen Zielorgane etwa im Herzen durch andere, Klotho-unabhängige, Signalwege an den FGF Rezeptoren wirken kann [15].

Bislang gab es keine Daten zur Expression der FGF Rezeptoren auf den drei Monozytensubpopulationen. In der vorgelegten Arbeit wurde die Expression von FGFR1, FGFR2 und Klotho bei nierengesunden Probanden und nierenkranken Patienten untersucht und jeweils eine erhöhte Expression von FGFR1, FGFR2 und Klotho auf CD16+ Monozyten im Vergleich zu klassischen Monozyten erkannt. Trotz des postulierten Klothodefizits nierenkranker Menschen [30] unterschied sich die Expression von α -Klotho auf den Monozytensubpopulationen jedoch nicht zwischen Dialysepatienten und gesunden Probanden.

Diese höhere Expressionsrate der FGF23 Rezeptoren und des α -Klothos auf CD16+ Monozyten lässt vermuten, dass diese Monozytensubpopulation besonders sensitiv auf erhöhte FGF23 Spiegel reagieren sollten.

Es wurden daher nachfolgend zwei unterschiedliche Versuchsansätze zur Untersuchung der potentiellen immunmodulatorischen Effekte des FGF23 auf Monozytensubpopulationen durchgeführt: Eine wenig-stündige Stimulation von ausdifferenzierten Monozyten sowie eine mehrtägige Stimulation auf sich differenzierende Monozyten.

Bei der Inkubation von ausdifferenzierten Monozyten mit rekombinantem FGF23 aus HEK293-Zellen für fünf Stunden zeigt FGF23 entgegen unserer Hypothese jedoch keine Wirkung auf die Monozytensubpopulationen: die Verteilung der Monozytensubpopulationen blieb stabil, es zeigten sich keine Veränderungen in funktionellen Eigenschaften und in der Expression von Oberflächenrezeptoren.

Dieser Widerspruch zu unseren epidemiologischen Ergebnissen, die einen Zusammenhang zwischen FGF23 und Monozytensubpopulationen suggerieren, warf die Frage auf, welche Gründe für die fehlende Wirkung von FGF23 auf die Monozytensubpopulationen in diesem experimentellen Forschungsansatz verantwortlich sein könnten. Als zwei mögliche Ursachen erwogen wir, dass entweder bei einem einmaligen Stimulus die Halbwertszeit des intakten FGF23 von 58 Minuten [37] im Vollblut zu kurz für einen Effekt auf Monozytensubpopulationen gewesen sein könnte, oder dass die Wirkung von FGF23 sich nur in einem früheren Stadium der Monozytenentwicklung entfaltet und dass bereits ausdifferenzierte Monozyten eher inert gegenüber FGF23 sind.

Da bisher weder detailliert bekannt ist, wie FGF23 physiologisch abgebaut wird, noch die Stabilität von FGF23 in vitro ausreichend untersucht wurde, lässt sich über einen möglichen Effekt der FGF23 Stabilität auf unsere Versuchsergebnisse allenfalls spekulieren. Als Limitation unserer Studie wurde insbesondere nicht erfasst, inwieweit sich die FGF23 Konzentration über die fünf Stunden der Stimulation veränderte.

Um zu untersuchen, ob FGF23 in einem früheren Entwicklungsprozess Einfluss auf die Monozytenentwicklung und -funktion einnimmt, wurde in einem weiteren experimentellen Versuchsansatz eine mehrtägige Stimulation von FGF23 auf sich differenzierende Monozyten getestet. Hierbei hatte FGF23 weder auf die Differenzierung von Monozyten noch auf die Expression von Oberflächenmarker oder die funktionellen Eigenschaften wie die ROS Produktion oder die Phagozytose eine Wirkung. In der höchsten verwendeten FGF23

Konzentration (100 ng/ml) zeigte sich sogar eine Reduktion der Expression von CX3CR1 (Abbildung 27) und der Anzahl der intermediären Monozyten. Diese Effekte erreichten zwar formal nicht das Signifikanzniveau, trotzdem könnte es sich hier um toxische Effekte des FGF23 in dieser hohen Konzentration handeln.

Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentration von FGF23 wurde aus bereits publizierten Arbeiten übernommen [4, 15]. Interessanterweise werden die höchsten, in diesen Vorarbeiten eingesetzten, Konzentrationen von FGF23 (100 ng/ml) nicht einmal von Dialysepatienten erreicht [75, 77]. Zwar ist die Spanne, in der sich FGF23 Werte bei CKD 5 Patienten bewegen, ist in der Literatur sehr unterschiedlich beschrieben und reicht von 2 ng/ml [75] bis 25 ng/ml [70]; jedenfalls ist 100 ng/ml vierfach höher als der höchste bei Dialysepatienten beschriebene Wert, so dass die klinische Relevanz von Experimenten mit solch hohen FGF23 Konzentrationen fragwürdig ist. Dennoch entschlossen wir uns, in dieser Dissertation zum Zwecke der Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Arbeitsgruppen neben niedrigeren auch diese sehr hohen Konzentrationen zu untersuchen [4, 15].

Die Ergebnisse der *in vitro* Versuche stehen nicht nur im Widerspruch zu den klinischen Daten aus dieser Arbeit, sondern auch zu bisherigen Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die auch *in vitro* einen Effekt von FGF23 auf Monozyten gezeigt haben [4, 75]. In diesen Vorarbeiten wurden Monozyten jedoch nicht in die drei Monozytensubpopulationen aufgeteilt, sondern immer nur als eine homogene Zellpopulation betrachtet. Zudem wurden andere methodische Analysen durchgeführt, wie Aktivitätsanalysen oder RT-PCR Experimente.

Unsere Ergebnisse stehen mit vorherigen Arbeiten alleine hinsichtlich der monozytären Expression von FGF Rezeptoren in Einklang [4]. Allerdings zeigten Bacchetta et al zusätzlich [4], dass nach Stimulation mit FGF23 für 6 h die Expression α -Klothos und nach 24 h die Expression von FGFR1 in Monozyten supprimiert wurde. In der vorgelegten Dissertationsarbeit wurde die Expression der FGF Rezeptoren nicht nach einer FGF23 Stimulation untersucht. Bacchetta et al [4] zeigten weiter, dass nach Stimulation mit FGF23 MAPK und AKT in PBMCm als intrazelluläre Signalkaskaden phosphoryliert werden; eine Behandlung mit FGF23 Inhibitoren verhinderte die Aktivierung dieser Signalwege. Schließlich zeigten Bacchetta et al [4], dass die Genexpression von CYP27B1, dem Schlüsselenzym der Bildung von aktivem Vitamin D, nach Stimulation mit FGF23 von Monozyten gesunder Probanden und von „Monozyten“ aus dem Peritonealdialysat von Dialysepatienten herunter reguliert wurde. Bei solchen peritonealen Zellen handelt es sich

allerdings eher um Makrophagen als um Monozyten, da die Bezeichnung Monozyten konventionellerweise auf Zellen im Blut fokussiert [80]. Es wurde schließlich neben der verminderten Expression von CYP27B1 auch die intrazelluläre Synthese von aktivem Vitamin D untersucht, die nach FGF23 Stimulation in den Monozyten und Makrophagen vermindert war.

Auch Viaene et al [75] untersuchten, ob FGF23 verantwortlich für die Dysregulation der monozytären CYP27B1 Expression bei Urämie ist und so einen Beitrag zur gesteigerten Infektanfälligkeit der Menschen mit chronischer Nierenerkrankung leisten kann. Sie zeigten zunächst erstaunlicherweise eine Überexpression von CYP27B1 und Vitamin D Rezeptoren bei Hämodialysepatienten. Die Hochregulation der CYP27B1 Expression, die in Monozyten gesunder Probanden nach Stimulation mit IFN γ und LPS beobachtet wurde, wurde jedoch durch Zugabe urämischen Serums vermindert. Monozyten, die zunächst nur mit FGF23 stimuliert wurden, zeigten einen leichten Abfall der CYP27B1 Expression. Diese CYP27B1 Reduktion war dann bei FGF23 Stimulation mit zusätzlicher Ko-Stimulation von IFN γ und LPS umso deutlicher. Wie relevant die Ergebnisse der dreifachen Stimulation für die klinische Übertragbarkeit auf chronisch nierenkranke Menschen sind, bleibt abzuwarten. Die zunächst partiell disruenten Ergebnisse der beiden Arbeitsgruppen werden klarer, wenn man die FGF23 Konzentrationen betrachtet, mit denen sie ihre Experimente durchführten. Viviane et al [75] arbeiteten mit FGF23 Konzentrationen von höchstens 5 ng/ml, entsprechend den Plasmakonzentrationen bei Dialysepatienten. Bacchetta et al. arbeiteten jedoch mit der zwanzigfach höheren Dosis von 100 ng/ml FGF23. So ist es nicht verwunderlich, dass die Ergebnisse partiell unterschiedlich ausfielen.

Im Gegensatz zu den beiden Arbeiten wurde in der vorliegenden Dissertation erstmals der Effekt von FGF23 auf Monozytensubpopulationen untersucht, um eine differenzierte Betrachtung des immunologischen Effektes von FGF23 zu erlauben. Der Effekt von FGF23 auf den Vitamin D Stoffwechsel in Monozyten konnte jedoch aus methodischen Gründen nicht untersucht werden.

8.5 FGF23 und Inflammation

Vorarbeiten konnten bereits auf klinisch-epidemiologischer [49] und tierexperimenteller [11] Ebene eine Assoziation zwischen FGF23 und Inflammation aufzeigen. So war in Analysen der CRIC Studie bei 3879 Patienten mit nicht-dialysepflichtiger chronischer

Nierenerkrankung unter allen getesteten Komponenten des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels FGF23 am stärksten mit proinflammatorischen Markern wie dem CPR und IL-6 korreliert [49]. Die Assoziation zwischen FGF23 und CRP konnte in unserer HOM sweet HOME Studie auch bei nierengesunden Menschen bestätigt werden. Als eine mögliche Ursache für die höheren Inflammationsmarker bei chronisch nierenkranken Patienten mit erhöhtem FGF23 wurde in den CRIC Studie diskutiert, dass FGF23 über Inhibition der CYP27B1 die Aktivierung des partiell antiinflammatorischen Vitamin D hemmt.

In Einklang damit erfolgte in den letzten Jahren eine ausgeprägte Fokussierung auf pleiotrope Vitamin D Effekte, welche eine Regulation inflammatorischer Signalkaskaden umfasst [4]. So exprimieren Monozyten einen funktionsfähigen Vitamin D Rezeptor (VDR), dessen Aktivierung zur Hochregulation des antimikrobiellen Proteins Cathelicidin [4] und zur verringerten Bildung pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und Il-6 [51] führt.

Rezente Studien suggerieren, dass in Einklang mit solchen antiinflammatorischen Wirkungen von Vitamin D eine Therapie mit VDR-Agonisten bei CKD Patienten einen CRP Abfall bewirkt [1].

8.6 Forschungsausblick

Zusammenfassend lässt sich aufgrund der Ergebnisse der vorgelegten Dissertationsschrift die Hypothese, dass eine Erhöhung von FGF23 einen relevanten Effekt auf die Monozytenbiologie ausübt und somit zum urämischen Immundefekte beiträgt, nicht bestätigen. Vielmehr erscheint aufgrund der kontroversen Untersuchungsergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen ein detaillierteres Verständnis der Regulationsmechanismes des angeborenen zellulären Immunsystems erforderlich, um die Bedeutung von FGF23 für die Monozytenbiologie aufzuklären.

Weiterführende Experimente sollten die Stimulation mit FGF23 bereits mit Beginn der zweiwöchigen Expansionsphase der hämatopoetischen Stammzellen beginnen, da diese Zellen *in vivo* schon im Knochenmark in Kontakt mit FGF23 kommen. Die in der vorgelegten Promotionsarbeit durchgeführten Experimente könnten den vulnerablen Zeitpunkt für die Wirkung FGF23 auf monozytäre Zellen verpasst haben, da FGF23 hier erst nach der vierzehntägigen Expansion – mit dem Wechsel zum Differenzierungsmedium – hinzugegeben wurde.

Es gilt auch zu erörtern, ob nicht das c-terminale FGF23, statt des intakten FGF23, einen Effekt auf Monozyten ausübt, da auch für c-terminales FGF23 eine biologische Aktivität nachgewiesen wurde [70]. In der vorgelegten Dissertation wurde bewusst intaktes FGF23 eingesetzt, was in Einklang mit dem klassischen Verständnis der FGF23 Funktion steht; zudem wurde in den meisten Voruntersuchungen intaktes FGF23 eingesetzt [4, 15, 75].

Schließlich könnte anstelle von FGF23 eine andere Komponente des gestörten Calcium-Phosphat-Stoffwechsels zum urämischen Immundefekt und der chronischen Inflammation beitragen [6]. Bekanntermaßen induzieren eine Hyperphosphatämie und Hypercalcämie in Gefäßmuskelzellen eine osteogenetische Transformation und somit einen wichtigen Schritt bei der Kalzifizierung [56]. Ob die Hyperphosphatämie und Hypercalcämie auch negative Effekte auf Monozyten und Makrophagen hat, sollten differenzierte Experimente zur urämiebedingten Monozytendysfunktion aufdecken müssen.

8.7 Therapieansätze

Auch wenn viele pathophysiologischen Zusammenhänge in der Regulation des phosphaturischen Hormons FGF23 nicht abschließend aufgedeckt sind, wurden bereits verschiedene therapeutische Modifikationen von FGF23 als neue Therapiestrategien in der chronischen Nierenerkrankung diskutiert.

Einer dieser Ansätze stellen die Inhibition und Elimination von FGF23 mittels eines monoklonalen FGF23 Antikörpers dar, welcher bereits tierexperimentell getestet wurde [66]: 5/6 nephrektomierte Ratten, die charakteristische Veränderungen des Calcium-Phosphat-Haushaltes ähnlich wie Dialysepatienten aufzeigten, wurden sechs Wochen mit unterschiedlichen Konzentrationen eines FGF23 Antikörpers behandelt. Während dadurch die Hypovitaminose D und der Hyperparathyroidismus verbessert werden konnten, stieg der Serum Phosphatspiegel dramatisch an. Als Folge nahmen die aortale Kalzifizierung sowie die Mortalitätsrate bei den behandelten Tieren dramatisch zu. Nebenefundlich blieben die renale Funktion, die ventrikuläre Hypertrophie und hämodynamische Parameter unverändert [66]. Die Ergebnisse stehen in Einklang mit Untersuchungen bei FGF23 knock out Mäusen, bei denen der Ausfall von FGF23 zu deutlich erhöhten Phosphatspiegeln und zu vaskulärer und Gewebs-Kalzifizierung führten [68].

Auch die Hoffnung, mittels Modifikation anderer Parameter des Calcium-Phosphat-Haushaltes einen benefiziellen Effekt auf den urämischen Immundefekt zu erreichen, wurde

enttäuscht: So wurde in einer randomisierten, doppelteblindeten Studie versucht, mittels Cholecalciferol Supplementation Monozyten und T-Lymphozyten zu beeinflussen [64]. Hierbei wurden Hämodialysepatienten mit einem Vitamin D Mangel zwölf Wochen mit Cholecalciferol supplementiert; erwartungsgemäß stieg der Cholecalciferolspiegel auf Normwerte an. Allerdings wurden andere Werte des Calcium Phosphatstoffwechsels wie das Plasma Parathormon und insbesondere die Verteilung der Monozytensubpopulationen, die monozytäre Zytokinbildung und die T-Zelldifferenzierung nicht beeinflusst.

Auch jenseits solcher Interventionen im Calcium-Phosphat-Haushalt fehlen in der klinischen Nephrologie momentan Therapieoptionen zur Behandlung der monozytären Dysfunktion bei CKD Patienten. Dennoch weisen einige Studien auf eine Beeinflussbarkeit der Monozytensubpopulationen hin. So sind bei adipösen Menschen die CD16+ Monozyten deutlich erhöht. Wird das Körpergewicht jedoch durch dietätische oder bariatrische Interventionen um mindestens 5 % reduziert, kommt es zu einer signifikanten Reduktion der CD14+CD16++ Monozyten [55].

Eine beeindruckende Depletion von nicht-klassischen Monozyten – nicht jedoch von intermediären Monozyten - gelang auch durch die Gabe von Glucocortikosteroiden [16, 26], die durch die Induktion der Apoptose [12] in den Monozyten zu erklären ist. Allerdings sind Glucocortikosteroide aufgrund ihres Nebenwirkungsprofils und der selektiven Wirkung auf nicht-klassischen, nicht jedoch auf die intermediären, Monozyten sicherlich keine geeignete Therapiestrategie zur Monozytenmodifikation.

Aus der Gastroenterologie stammen ermutigen Studien, welche eine Elimination von intermediären Monozyten mittels extrakorporaler Verfahren suggerieren: So ist bei entzündlichen Darmerkrankungen - ähnlich wie bei anderen chronisch-inflammatorischen Erkrankungen - die Anzahl der CD16+ Monozyten deutlich erhöht. Hier gelang es, die Anzahl der CD16+ Monozyten durch selektive Granulozyten/Monozyten Adsorption mittels der sogenannten Adacolumn zu reduzieren [24]. Diese Adsorptionssäulen enthalten Cellulose-Acetat-Beads, an welche Immunglobuline binden. Aufgrund ihrer Oberflächenexpression von Immunglobulinrezeptoren adhären nachfolgend Granulozyten und Monozyten an diese Beads. Da CD16+ Monozyten vermehrt Immunglobulinrezeptoren exprimieren, adhären diese Zellen stärker als klassische (CD16-) Monozyten. Die Ergebnisse sind vielversprechend, jedoch sind höheres Alter und schwerere Grunderkrankung ungünstige Prädiktoren für den Therapieerfolg. Eine Übertragung dieser Therapieoption auf andere entzündliche Erkrankungen und Untersuchungen zu Langzeiteffekten stehen aus [23, 24].

Eine weitere Möglichkeit, die Monozyten subpopulationsspezifisch zu beeinflussen, gelang über die Wahl des Nierenersatzfahrens. So senkt eine online Hämodiafiltration gegenüber der konventionellen Hämodialysetherapie die Anzahl zirkulierender CD16+ Monozyten [7]. Kürzlich konnte eine multizentrische randomisierte kontrollierte Studie an 906 Dialysepatienten gar eine Reduktion der Gesamtsterblichkeit bei Einsatz von Hämodiafiltration aufzeigen; allerdings wurden in dieser Studie keine immunologischen Untersuchungen durchgeführt, welche erlaubte, eine Assoziation zwischen Immuneffekten und klinischen Ereignissen zu untersuchen [46].

8.8 Schlussfolgerung

Da in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe einerseits ein Anstieg der Zellzahlen intermediärer Monozyten bei chronisch nierenkranken Patienten erkannt worden war, andererseits die Zellzahlen der intermediären Monozyten als unabhängige Prädiktoren für kardiovaskuläre Ereignisse bei chronisch nierenkranken Menschen [59] identifiziert worden waren, sollten nun die zugrundeliegenden Pathomechanismen entschlüsselt werden, die für die Zunahme intermediärer Monozyten bei chronisch nierenkranken Menschen verantwortlich sind. Aufgrund von Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen, die relevante Effekte des phosphaturischen Hormons FGF23 auf die Monozytendysfunktion bei CKD postulierten, sollte in der vorliegenden Arbeit nun erstmals untersucht werden, ob FGF23 die Verteilung und die Funktion der Monozytensubpopulationen beeinflusst.

Klinisch-epidemiologische Untersuchungen zeigten, dass FGF23 der Parameter des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels war, der die stärkste Assoziation mit der Anzahl intermediärer Monozyten aufwies. *in vitro* konnte zwar erstmals eine unterschiedliche Expression von FGFR1, FGFR2 und Klotho auf Monozytensubpopulationen beschrieben werden; im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen konnte allerdings kein klarer Zusammenhang zwischen FGF23 und der Monozytendysfunktion festgestellt werden.

Diese Ergebnisse dämpfen die Hoffnung, dass eine pharmakologische Verminderung der erhöhten FGF23 Plasmaspiegel bei chronisch nierenkranken Menschen benefizielle Effekte auf die urämische Monozytendysfunktion hat.

9. Literaturverzeichnis

1. Alborzi, P., Patel, N. A., Peterson, C., Bills, J. E., Bekele, D. M., Bunaye, Z., Light, R. P., and Agarwal, R. 2008. Paricalcitol reduces albuminuria and inflammation in chronic kidney disease: a randomized double-blind pilot trial. *Hypertension* 52: 249.
2. Ancuta, P., Rao, R., Moses, A., Mehle, A., Shaw, S. K., Luscinskas, F. W., and Gabuzda, D. 2003. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med* 197: 1701.
3. Arnlov, J., Carlsson, A. C., Sundstrom, J., Ingelsson, E., Larsson, A., Lind, L., and Larsson, T. E. 2013. Higher fibroblast growth factor-23 increases the risk of all-cause and cardiovascular mortality in the community. *Kidney Int* 83: 160.
4. Bacchetta, J., Sea, J. L., Chun, R. F., Lisse, T. S., Wesseling-Perry, K., Gales, B., Adams, J. S., Salusky, I. B., and Hewison, M. 2013. Fibroblast growth factor 23 inhibits extrarenal synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D in human monocytes. *J Bone Miner Res* 28: 46.
5. Ben-Dov, I. Z., Galitzer, H., Lavi-Moshayoff, V., Goetz, R., Kuro-o, M., Mohammadi, M., Sirkis, R., Naveh-Many, T., and Silver, J. 2007. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest* 117: 4003.
6. Block, G. A., Hulbert-Shearon, T. E., Levin, N. W., and Port, F. K. 1998. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis* 31: 607.
7. Carracedo, J., Merino, A., Nogueras, S., Carretero, D., Berdud, I., Ramirez, R., Tetta, C., Rodriguez, M., Martin-Malo, A., and Aljama, P. 2006. On-line hemodiafiltration reduces the proinflammatory CD14+CD16+ monocyte-derived dendritic cells: A prospective, crossover study. *J Am Soc Nephrol* 17: 2315.
8. Cohen, G., and Horl, W. H. 2012. Immune dysfunction in uremia;an update. *Toxins (Basel)* 4: 962.
9. Coresh, J., Selvin, E., Stevens, L. A., Manzi, J., Kusek, J. W., Eggers, P., Van Lente, F., and Levey, A. S. 2007. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA* 298: 2038.
10. Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S. Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S. K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J. P., D'Cruz, D., Casanova, J. L., Trouillet, C., and Geissmann, F. 2010. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33: 375.
11. Dai, B., David, V., Martin, A., Huang, J., Li, H., Jiao, Y., Gu, W., and Quarles, L. D. 2012. A comparative transcriptome analysis identifying FGF23 regulated genes in the kidney of a mouse CKD model. *PLoS One* 7: e44161.
12. Dayyani, F., Belge, K. U., Frankenberger, M., Mack, M., Berki, T., and Ziegler-Heitbrock, L. 2003. Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14+CD16+ monocytes. *J Leukoc Biol* 74: 33.
13. Dopheide, J. F., Obst, V., Doppler, C., Radmacher, M. C., Scheer, M., Radsak, M. P., Gori, T., Warnholtz, A., Fottner, C., Daiber, A., Munzel, T., and Espinola-Klein, C. 2012. Phenotypic characterisation of pro-inflammatory monocytes and dendritic cells in peripheral arterial disease. *Thromb Haemost* 108: 1198.
14. Eleftheriadis, T., Antoniadi, G., Liakopoulos, V., Kartsios, C., and Stefanidis, I. 2007. Disturbances of acquired immunity in hemodialysis patients. *Semin Dial* 20: 440.
15. Faul, C., Amaral, A. P., Oskouei, B., Hu, M. C., Sloan, A., Isakova, T., Gutierrez, O. M., Aguillon-Prada, R., Lincoln, J., Hare, J. M., Mundel, P., Morales, A., Scialla, J., Fischer, M., Soliman, E. Z., Chen, J., Go, A. S., Rosas, S. E., Nessel, L., Townsend, R. R., Feldman, H. I., St John Sutton, M., Ojo, A., Gadegbeku, C., Di Marco, G. S.,

- Reuter, S., Kentrup, D., Tiemann, K., Brand, M., Hill, J. A., Moe, O. W., Kuro, O. M., Kusek, J. W., Keane, M. G., and Wolf, M. 2011. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 121: 4393.
16. Fingerle-Rowson, G., Angstwurm, M., Andreesen, R., and Ziegler-Heitbrock, H. W. 1998. Selective depletion of CD14⁺ CD16⁺ monocytes by glucocorticoid therapy. *Clin Exp Immunol* 112: 501.
17. Foley, R. N., Parfrey, P. S., Kent, G. M., Harnett, J. D., Murray, D. C., and Barre, P. E. 1998. Long-term evolution of cardiomyopathy in dialysis patients. *Kidney Int* 54: 1720.
18. Foley, R. N., Parfrey, P. S., and Sarnak, M. J. 1998. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 32: S112.
19. Galitzer, H., Ben-Dov, I. Z., Silver, J., and Naveh-Many, T. 2010. Parathyroid cell resistance to fibroblast growth factor 23 in secondary hyperparathyroidism of chronic kidney disease. *Kidney Int* 77: 211.
20. Girndt, M., Sester, M., Sester, U., Kaul, H., and Kohler, H. 2001. Defective expression of B7-2 (CD86) on monocytes of dialysis patients correlates to the uremia-associated immune defect. *Kidney Int* 59: 1382.
21. Gordon, S. 2012. Targeting a monocyte subset to reduce inflammation. *Circ Res* 110: 1546.
22. Gutierrez, O. M., Mannstadt, M., Isakova, T., Rauh-Hain, J. A., Tamez, H., Shah, A., Smith, K., Lee, H., Thadhani, R., Juppner, H., and Wolf, M. 2008. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 359: 584.
23. Hanai, H., Iida, T., Takeuchi, K., Watanabe, F., Yamada, M., Kikuyama, M., Maruyama, Y., Iwaoka, Y., Hirayama, K., Nagata, S., and Takai, K. 2008. Adsorptive depletion of elevated proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 103: 1210.
24. Hanai, H., Takeda, Y., Eberhardson, M., Gruber, R., Saniabadi, A. R., Winqvist, O., and Lofberg, R. 2011. The mode of actions of the Adacolumn therapeutic leucocytapheresis in patients with inflammatory bowel disease: a concise review. *Clin Exp Immunol* 163: 50.
25. Hansson, G. K. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352: 1685.
26. Heimbeck, I., Hofer, T. P., Eder, C., Wright, A. K., Frankenberger, M., Marei, A., Boghdadi, G., Scherberich, J., and Ziegler-Heitbrock, L. 2010. Standardized single-platform assay for human monocyte subpopulations: Lower CD14⁺CD16⁺⁺ monocytes in females. *Cytometry A* 77: 823.
27. Heine, G. H., Ulrich, C., Seibert, E., Seiler, S., Marell, J., Reichart, B., Krause, M., Schlitt, A., Kohler, H., and Girndt, M. 2008. CD14⁽⁺⁺⁾CD16⁺ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Int* 73: 622.
28. Heine, G. H., Ortiz, A., Massy, Z. A., Lindholm, B., Wiecek, A., Martinez-Castelao, A., Covic, A., Goldsmith, D., Suleymanlar, G., London, G. M., Parati, G., Sicari, R., Zoccali, C., and Fliser, D. 2012. Monocyte subpopulations and cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 8: 362.
29. Herzog, C. A., Asinger, R. W., Berger, A. K., Charytan, D. M., Diez, J., Hart, R. G., Eckardt, K. U., Kasiske, B. L., McCullough, P. A., Passman, R. S., DeLoach, S. S., Pun, P. H., and Ritz, E. 2011. Cardiovascular disease in chronic kidney disease. A clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 80: 572.

30. Hu, M. C., Shi, M., Zhang, J., Quinones, H., Griffith, C., Kuro-o, M., and Moe, O. W. 2011. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 22: 124.
31. Hu, M. C., Shiizaki, K., Kuro-o, M., and Moe, O. W. 2013. Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annu Rev Physiol* 75: 503.
32. Isakova, T., Wahl, P., Vargas, G. S., Gutierrez, O. M., Scialla, J., Xie, H., Appleby, D., Nessel, L., Bellovich, K., Chen, J., Hamm, L., Gadegbeku, C., Horwitz, E., Townsend, R. R., Anderson, C. A., Lash, J. P., Hsu, C. Y., Leonard, M. B., and Wolf, M. 2011. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int* 79: 1370.
33. Isakova, T., Xie, H., Barchi-Chung, A., Vargas, G., Sowden, N., Houston, J., Wahl, P., Lundquist, A., Epstein, M., Smith, K., Contreras, G., Ortega, L., Lenz, O., Briones, P., Egbert, P., Ikizler, T. A., Jueppner, H., and Wolf, M. 2011. Fibroblast growth factor 23 in patients undergoing peritoneal dialysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 6: 2688.
34. Ix, J. H., Katz, R., Kestenbaum, B. R., de Boer, I. H., Chonchol, M., Mukamal, K. J., Rifkin, D., Siscovick, D. S., Sarnak, M. J., and Shlipak, M. G. 2012. Fibroblast growth factor-23 and death, heart failure, and cardiovascular events in community-living individuals: CHS (Cardiovascular Health Study). *J Am Coll Cardiol* 60: 200.
35. Kato, S., Chmielewski, M., Honda, H., Pecoits-Filho, R., Matsuo, S., Yuzawa, Y., Tranaeus, A., Stenvinkel, P., and Lindholm, B. 2008. Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 3: 1526.
36. Kendrick, J., Cheung, A. K., Kaufman, J. S., Greene, T., Roberts, W. L., Smits, G., and Chonchol, M. 2011. FGF-23 associates with death, cardiovascular events, and initiation of chronic dialysis. *J Am Soc Nephrol* 22: 1913.
37. Khosravi, A., Cutler, C. M., Kelly, M. H., Chang, R., Royal, R. E., Sherry, R. M., Wodajo, F. M., Fedarko, N. S., and Collins, M. T. 2007. Determination of the elimination half-life of fibroblast growth factor-23. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 2374.
38. Larsson, T., Nisbeth, U., Ljunggren, O., Juppner, H., and Jonsson, K. B. 2003. Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. *Kidney Int* 64: 2272.
39. Lavi-Moshayoff, V., Wasserman, G., Meir, T., Silver, J., and Naveh-Many, T. 2010. PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F882.
40. Leuschner, F., Dutta, P., Gorbato, R., Novobrantseva, T. I., Donahoe, J. S., Courties, G., Lee, K. M., Kim, J. I., Markmann, J. F., Marinelli, B., Panizzi, P., Lee, W. W., Iwamoto, Y., Milstein, S., Epstein-Barash, H., Cantley, W., Wong, J., Cortez-Retamozo, V., Newton, A., Love, K., Libby, P., Pittet, M. J., Swirski, F. K., Kotliansky, V., Langer, R., Weissleder, R., Anderson, D. G., and Nahrendorf, M. 2011. Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice. *Nat Biotechnol* 29: 1005.
41. Libby, P., Ridker, P. M., and Hansson, G. K. 2009. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol* 54: 2129.
42. Libby, P., Ridker, P. M., and Hansson, G. K. 2011. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473: 317.
43. Lim, K., Lu, T. S., Molostvov, G., Lee, C., Lam, F. T., Zehnder, D., and Hsiao, L. L. 2012. Vascular Klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23. *Circulation* 125: 2243.

44. Liu, S., Tang, W., Zhou, J., Stubbs, J. R., Luo, Q., Pi, M., and Quarles, L. D. 2006. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol* 17: 1305.
45. Lutgens, E., Faber, B., Schapira, K., Evelo, C. T., van Haften, R., Heeneman, S., Cleutjens, K. B., Bijmens, A. P., Beckers, L., Porter, J. G., Mackay, C. R., Rennert, P., Bailly, V., Jarpe, M., Dolinski, B., Koteliensky, V., de Fougères, T., and Daemen, M. J. 2005. Gene profiling in atherosclerosis reveals a key role for small inducible cytokines: validation using a novel monocyte chemoattractant protein monoclonal antibody. *Circulation* 111: 3443.
46. Maduell, F., Moreso, F., Pons, M., Ramos, R., Mora-Macia, J., Carreras, J., Soler, J., Torres, F., Campistol, J. M., and Martínez-Castellano, A. 2013. High-efficiency postdilution online hemodiafiltration reduces all-cause mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 24: 487.
47. Merino, A., Buendia, P., Martín-Malo, A., Aljama, P., Ramirez, R., and Carracedo, J. 2011. Senescent CD14⁺CD16⁺ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *J Immunol* 186: 1809.
48. Meyer, T. W., and Hostetter, T. H. 2007. Uremia. *N Engl J Med* 357: 1316.
49. Muñoz Mendoza, J., Isakova, T., Ricardo, A. C., Xie, H., Navaneethan, S. D., Anderson, A. H., Bazzano, L. A., Xie, D., Kretzler, M., Nessel, L., Hamm, L. L., Negrea, L., Leonard, M. B., Raj, D., and Wolf, M. 2012. Fibroblast growth factor 23 and Inflammation in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 7: 1155.
50. Nockher, W. A., and Scherberich, J. E. 1998. Expanded CD14⁺ CD16⁺ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect Immun* 66: 2782.
51. Norman, P. E., and Powell, J. T. 2014. Vitamin d and cardiovascular disease. *Circ Res* 114: 379.
52. Ozaki, Y., Imanishi, T., Taruya, A., Aoki, H., Masuno, T., Shiono, Y., Komukai, K., Tanimoto, T., Kitabata, H., and Akasaka, T. 2012. Circulating CD14⁺CD16⁺ monocyte subsets as biomarkers of the severity of coronary artery disease in patients with stable angina pectoris. *Circ J* 76: 2412.
53. Pahl, M. V., Vaziri, N. D., Yuan, J., and Adler, S. G. 2010. Upregulation of monocyte/macrophage HGF-1 (Gpmb/Osteoactivin) expression in end-stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 5: 56.
54. Passlick, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H. W. 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74: 2527.
55. Poitou, C., Dalmat, E., Renovato, M., Benhamo, V., Hajdouch, F., Abdenour, M., Kahn, J. F., Veyrie, N., Rizkalla, S., Fridman, W. H., Sautes-Fridman, C., Clement, K., and Cremer, I. 2011. CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ monocytes in obesity and during weight loss: relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 2322.
56. Reynolds, J. L., Joannides, A. J., Skepper, J. N., McNair, R., Schurgers, L. J., Proudfoot, D., Jahnke-Dechent, W., Weissberg, P. L., and Shanahan, C. M. 2004. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 15: 2857.
57. Rimmucci, M., Collins, M. T., Fedarko, N. S., Cherman, N., Corsi, A., White, K. E., Waguespack, S., Gupta, A., Hannon, T., Econs, M. J., Bianco, P., and Gheron Robey, P. 2003. FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting. *J Clin Invest* 112: 683.

58. Rogacev, K. S., and Heine, G. H. 2010. Human monocyte heterogeneity--a nephrological perspective. *Nephrol Ther* 6: 219.
59. Rogacev, K. S., Seiler, S., Zawada, A. M., Reichart, B., Herath, E., Roth, D., Ulrich, C., Fliser, D., and Heine, G. H. 2011. CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur Heart J* 32: 84.
60. Rogacev, K. S., Cremers, B., Zawada, A. M., Seiler, S., Binder, N., Ege, P., Grosse-Dunker, G., Heisel, I., Hornof, F., Jeken, J., Rebling, N. M., Ulrich, C., Scheller, B., Bohm, M., Fliser, D., and Heine, G. H. 2012. CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol* 60: 1512.
61. Ronco, C., Haapio, M., House, A. A., Anavekar, N., and Bellomo, R. 2008. Cardiorenal syndrome. *J Am Coll Cardiol* 52: 1527.
62. Ross, R., and Glomset, J. A. 1976. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med* 295: 369.
63. Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C., and Wagner, U. 2012. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum* 64: 671.
64. Seibert, E., Heine, G. H., Ulrich, C., Seiler, S., Kohler, H., and Girndt, M. 2013. Influence of cholecalciferol supplementation in hemodialysis patients on monocyte subsets: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Nephron Clin Pract* 123: 209.
65. Seiler, S., Cremers, B., Rebling, N. M., Hornof, F., Jeken, J., Kersting, S., Steimle, C., Ege, P., Fehrenz, M., Rogacev, K. S., Scheller, B., Bohm, M., Fliser, D., and Heine, G. H. 2011. The phosphatonin fibroblast growth factor 23 links calcium-phosphate metabolism with left-ventricular dysfunction and atrial fibrillation. *Eur Heart J* 32: 2688.
66. Shalhoub, V., Shatzken, E. M., Ward, S. C., Davis, J., Stevens, J., Bi, V., Renshaw, L., Hawkins, N., Wang, W., Chen, C., Tsai, M. M., Cattley, R. C., Wronski, T. J., Xia, X., Li, X., Henley, C., Eschenberg, M., and Richards, W. G. 2012. FGF23 neutralization improves chronic kidney disease-associated hyperparathyroidism yet increases mortality. *J Clin Invest* 122: 2543.
67. Shimada, T., Hasegawa, H., Yamazaki, Y., Muto, T., Hino, R., Takeuchi, Y., Fujita, T., Nakahara, K., Fukumoto, S., and Yamashita, T. 2004. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* 19: 429.
68. Shimada, T., Kakitani, M., Yamazaki, Y., Hasegawa, H., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S., Tomizuka, K., and Yamashita, T. 2004. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 113: 561.
69. Shimada, T., Urakawa, I., Yamazaki, Y., Hasegawa, H., Hino, R., Yoneya, T., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S., and Yamashita, T. 2004. FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 409.
70. Shimada, T., Urakawa, I., Isakova, T., Yamazaki, Y., Epstein, M., Wesseling-Perry, K., Wolf, M., Salusky, I. B., and Juppner, H. 2010. Circulating fibroblast growth factor 23 in patients with end-stage renal disease treated by peritoneal dialysis is intact and biologically active. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 578.
71. Shulman, N. B., Ford, C. E., Hall, W. D., Blaufox, M. D., Simon, D., Langford, H. G., and Schneider, K. A. 1989. Prognostic value of serum creatinine and effect of treatment of hypertension on renal function. Results from the hypertension detection and follow-up program. The Hypertension Detection and Follow-up Program Cooperative Group. *Hypertension* 13: I80.

72. Stenvinkel, P., Pecoits-Filho, R., and Lindholm, B. 2003. Coronary artery disease in end-stage renal disease: no longer a simple plumbing problem. *J Am Soc Nephrol* 14: 1927.
73. Stenvinkel, P., Ketteler, M., Johnson, R. J., Lindholm, B., Pecoits-Filho, R., Riella, M., Heimbürger, O., Cederholm, T., and Girndt, M. 2005. IL-10, IL-6, and TNF- α : central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int* 67: 1216.
74. Urakawa, I., Yamazaki, Y., Shimada, T., Iijima, K., Hasegawa, H., Okawa, K., Fujita, T., Fukumoto, S., and Yamashita, T. 2006. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 444: 770.
75. Viaene, L., Evenepoel, P., Meijers, B., Vanderschueren, D., Overbergh, L., and Mathieu, C. 2012. Uremia suppresses immune signal-induced CYP27B1 expression in human monocytes. *Am J Nephrol* 36: 497.
76. Weber, C., Belge, K. U., von Hundelshausen, P., Draude, G., Steppich, B., Mack, M., Frankenberger, M., Weber, K. S., and Ziegler-Heitbrock, H. W. 2000. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol* 67: 699.
77. Wolf, M. 2012. Update on fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease. *Kidney Int* 82: 737.
78. Yamashita, T., Yoshioka, M., and Itoh, N. 2000. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 277: 494.
79. Zawada, A. M., Rogacev, K. S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R. R., Fliser, D., and Heine, G. H. 2011. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118: e50.
80. Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J., Liu, Y. J., MacPherson, G., Randolph, G. J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J. M., and Lutz, M. B. 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116: e74.

10. Präsentationen

Teilergebnisse der Dissertation wurden im Rahmen von Posterpräsentationen und Vorträgen vorgestellt:

1. Aurelia Luthe, Adam M. Zawada, Sarah Seiler, Kyrill S. Rogacev, Danilo Fliser, Gunnar H. Heine - Die vermeintliche FGF23 induzierte Monozytenaktivierung ist verursacht durch eine LPS-Kontamination – 4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Hamburg 2012 (Posterpräsentation)
2. Aurelia Luthe, Adam M. Zawada, Sarah Seiler, Kyrill S. Rogacev, Danilo Fliser, Gunnar H. Heine - Bedingt ein Hyperphosphatonismus die Monozytendysfunktion chronisch nierenkranker Menschen? – 119. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V., Wiesbaden 2013 (Posterpräsentation)
3. Adam M. Zawada, Aurelia Luthe, Sarah Seiler, Kyrill S. Rogacev, Danilo Fliser, Gunnar H. Heine - Does FGF23 contribute to CKD-associated immune dysfunction? – 50. Jahreskongress der ERA-EDTA (European Renal Association - European Dialyse and Transplant Association), Istanbul 2013 (Posterpräsentation)
4. Aurelia Luthe, Adam M. Zawada, Sarah Seiler, Kyrill S. Rogacev, Danilo Fliser, Gunnar H. Heine - Bedingt ein Hyperphosphationismus die Monozytendysfunktion chronisch nierenkranker Menschen? – Tagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie zur wissenschaftlichen Nachwuchsförderung „Junge Niere“, Regensburg 2013 (Vortrag)

10.1 Stipendium

Die vorgelegte Dissertation wurde 2012 vom Verband Deutscher Nierenzentren mit einem Promotionsstipendium gefördert.

11. Danksagung

Bei folgenden Personen möchte ich mich bedanken, ohne deren Unterstützung die vorliegende Arbeit nicht entstanden wäre:

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Gunnar H. Heine meinen besonderen Dank aussprechen, der mir das Thema zur Verfügung stellte, mich mit großem Enthusiasmus unterstützte, immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und mir stets Anregungen gab.

Gleichermaßen danke ich Herrn Prof. Dr. med. D. Fliser für die Möglichkeit zur Promotion in der Klinik für Innere Medizin IV.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Adam M. Zawada bedanken, von dem ich den Einstieg in das wissenschaftliche Arbeiten im Labor lernte. Ohne seine unermüdliche Hilfe und große Diskussionsbereitschaft hätte mir die Forschung wohl nicht so viel Freude bereitet.

Ich möchte mich bei den Krankenschwestern und Krankenpflegern der Dialyse und der nephrologischen Ambulanz, Frau Martina Wagner im Labor und besonders bei Frau Marie Blinn für die Unterstützung bei der Dialysestudie bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden, die mich unterstützten. Ohne ihre Förderung und ihr Vertrauen wäre die Arbeit beschwerlicher gewesen.

12. Anhang

12.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
A	Anzahl
BMI	„ <i>Body Mass Index</i> “
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CCL5	„ <i>Chemokine (C-C motif) Ligand 5</i> “
CCR2	„ <i>Chemokine (C-C motif) Receptor 2</i> “
CCR5	„ <i>Chemokine (C-C motif) Receptor 5</i> “
CD	„ <i>Cluster of Differentiation</i> “
CFDA-SE	Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl Ester
CKD	„ <i>Chronic Kidney Disease</i> “
CKD-MBD	„ <i>Chronic Kidney Disease -Mineral and Bone Disorder</i> “
CO ₂	Kohlendioxid
CRP	C-reaktives Protein
CVD	„ <i>Cardiovascular Disease</i> “
CX ₃ CR1	„ <i>Chemokin (C-X3-C motif) Receptor 1</i> “
CXCL1	„ <i>Chemokin (C-X3-C motif) Ligand 1</i> “
CYP27B1	Cytochrome P450, Familie 27, Subfamilie B, Polypeptid 1
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
DiaBD	Diastolischer Blutdruck

dl	Deziliter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFR-EPI	<i>„Estimated Glomerular Filtration Rate Epidemiology Colaboration Institute“</i>
ESRD	<i>„End Stage Renal Disease“</i>
FACS	<i>„Fluorescence Activated Cell Sorting“</i>
FCS	<i>„Fetal Calf Serum“</i>
FGF23	<i>„Fibroblast Growth Factor 23“</i>
FGFR1	<i>„Fibroblast Growth Factor Receptor 1“</i>
FGFR2	<i>„Fibroblast Growth Factor Receptor 2“</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyant
FSC	<i>„Forward Scatter“</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
h	<i>„hour“</i>
H ₂ DFFDA	5-(und-6)-Carboxy-2',7'-Dihydro-Fluorescein-Diacetat
MCP-1	<i>„Chemokin Monocyte Chemotactic Protein 1“</i>
HIV	<i>„Human Immunodeficiency Virus“</i>
HOM sweet HOMe	<i>„Heterogeneity of monocytes in subjects who undergo elective coronary angiography – The Homburg evaluation“</i>
HSA	Humanes Serum Albumin
IFN γ	Interferon gamma
Il	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
m ²	Quadratmeter
MACS	<i>„Magnetic Activated Cell Sorting“</i>

UK	United Kingdom
MFI	<i>„Median Fluorescence Intensity“</i>
ANOVA	<i>„Analysis of Variance“</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>„Major Histocompatibility Complex“</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mRNA	<i>„Messenger Ribonuklein Acid“</i>
n	Anzahl
ng	Nanogramm
p	<i>„Probability Value“</i>
PBMC	<i>„Peripheral Blood Mononuclear Cell“</i>
PBMCm	<i>„Peripheral Blood Mononuclear Cell Monocyte“</i>
PBS	<i>„Phosphate Buffered Saline“</i>
PFA	Paraformaldehyd
PLC γ	<i>„Phospholipase C, gamma1“</i>
MAPK	<i>„Mitogen-activated protein kinase“</i>
PTH	Parathormon
ROS	<i>„Reactive Oxygen Species“</i>
BD	Blutdruck
rpm	<i>„Revolutions per Minute“</i>
RT-PCR	<i>„Real Time-Polymerase Chain Reaction“</i>
rU	<i>„real Unit“</i>

SCF	<i>„Stem Cell Factor“</i>
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
SEM	<i>„Standart Error of the Mean“</i>
SSC	<i>„Side Scatter“</i>
Syst BD	systolischer Blutdruck
TLR7	<i>„Toll Like Receptor 7“</i>
TLR8	<i>„Toll Like Receptor 8“</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thrombopoietin
VDR	Vitamin D Rezeptor
w	weiblich

12.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der Durchflusszytometrie	25
Abbildung 2: Gating der Gesamtmonozyten nach Expression des Panmonozytenmarkers CD86 und des Seitwärtsstreulichts.....	26
Abbildung 3: Einteilung der Zellpopulationen im Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC).....	26
Abbildung 4: Monozytensubpopulationen eingeteilt nach CD14 und CD16 Expression	27
Abbildung 5: Trennung der PBMCs durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll	29
Abbildung 6: Wirkungsweise der ROS Nachweisreagenz 5-(und-6)-Carboxy-2',7'-dihydrofluorescein-Diacetat (H2DFFDA).	33
Abbildung 7: Anzahl der klassischen Monozyten nach Stratifizierung der Probanden in FGF23 Quartile	37
Abbildung 8: Anzahl der intermediären Monozyten nach Stratifizierung der Probanden in FGF23 Quartile	38
Abbildung 9: Anzahl der nicht-klassischen Monozyten nach Stratifizierung der Probanden in FGF23 Quartile	38
Abbildung 10: Anzahl der klassischen Monozyten nach Stratifizierung der Probanden in FGF23 Quartile	42
Abbildung 11: Anzahl der nicht-klassischen Monozyten nach Stratifizierung der Probanden in FGF23 Quartile	43
Abbildung 12: Anzahl der nicht-klassischen Monozyten nach Stratifizierung der Probanden in FGF23 Quartile	44
Abbildung 13: Durchflusszytometrische Darstellung von Monozytensubpopulationen	45
Abbildung 14: Expression des FGFR1 Rezeptors auf Monozytensubpopulationen	46
Abbildung 15: Expression des FGFR2 Rezeptors auf Monozytensubpopulationen	47
Abbildung 16: Expression von membranständigem Klotho auf Monozytensubpopulationen	47

Abbildung 17: Anzahl der Monozytensubpopulationen nach 5 h Stimulation.....	48
Abbildung 18: CD86 Expression von Monozytensubpopulationen nach 5 Stunden Stimulation mit rekombinantem FGF23 aus HEK 293 Zellen	48
Abbildung 19: Anzahl der Monozytensubpopulationen nach 5 h Stimulation mit LPS.....	49
Abbildung 20: CD86 Expression der Monozytensubpopulationen nach 5 h Stimulation mit LPS	50
Abbildung 21: Anzahl der Monozytensubpopulationen nach 5 h Stimulation mit rekombinanten FGF23 aus NS0 Zellen	50
Abbildung 22: CD86 Expression der Monozytensubpopulationen nach 5 h Stimulation mit FGF23 aus NS0 Zellen	51
Abbildung 23: CCR5 Expression auf den Monozytensubpopulationen nach 5 h Stimulation mit FGF23.	52
Abbildung 24: CX ₃ CR1 Expression auf den Monozytensubpopulationen nach 5 h Stimulation mit FGF23.....	52
Abbildung 25: Phagozytoserate CD14++CD16- Monozyten	53
Abbildung 26: Induktion der T-Zellproliferation an Tag 4 der Stimulation	53
Abbildung 27: ROS Produktion der Monozytensubpopulationen nach fünfstündiger Stimulation mit FGF23.....	54
Abbildung 28: Überprüfung der Reinheit gewonnener hämatopoetischer Stammzellen	55
Abbildung 29: Expansion der hämatopoetischen Stammzellen.....	56
Abbildung 30: Durchflusszytometrische Bestimmung der Rezeptoren FGFR1, FGFR2 und Klotho.....	56
Abbildung 31: Entwicklung der hämatopoetischen Stammzellen	57
Abbildung 32: Lichtmikroskopische Aufnahme einer dendritischen Zelle	57
Abbildung 33: Prozentzahlen der intermediären Monozyten an den Tagen der Messungen .	58
Abbildung 34: Expression des Oberflächenrezeptors CCR5 auf differenzierten Monozyten	59

Abbildung 35: Expression des Oberflächenrezeptors CX ₃ CR1 auf den differenzierten Monozyten.....	59
Abbildung 36: Phagozytoserate intermediärer Monozyten am 8. Tag der Differenzierung...	60
Abbildung 37: ROS Produktion der Monozytensubpopulationen nach Stimulation mit FGF23	61

12.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	17
Tabelle 2: Antikörper	17
Tabelle 3: Chemikalien	18
Tabelle 4: Kits und Enzyme	19
Tabelle 5: Gebrauchsfertige Puffer, Lösungen und Medien	19
Tabelle 6: Puffer, Lösungen und Medien	20
Tabelle 7: Baseline Charakteristika der HOM sweet HOME Studienteilnehmer	36
Tabelle 8: Multiple lineare Regressionsanalyse mit intermediären Monozyten als abhängiger Variable	40
Tabelle 9: Baselinecharakteristika der Dialysepatienten.....	41

12.4 Fragebogen Dialysestudie

Untersuchungsdatum _____

Proband: _____

Geburtsdatum: _____

Geschlecht: _____

1. Hatten Sie in den letzten 2 Wochen vor der Blutentnahme im August 2012 einen akuten Infekt?

☐ Ja, ohne Fieber $>38,5^{\circ}\text{C}$ Details _____

☐ Ja, mit Fieber $>38,5^{\circ}\text{C}$ Details _____

☐ Nein

2. Haben Sie jemals geraucht?

☐ Ja

☐ Nein (weiter mit Frage 7)

3. Rauchen Sie aktuell?

☐ Ja (weiter mit Frage 6)

☐ Nein

4. Wann haben Sie die letzte Zigarette geraucht?

5. Wie viele Jahre haben Sie insgesamt geraucht?

6. Wie viele Päckchen haben Sie durchschnittlich am Tag über all diese Jahre geraucht?

7. Hat Ihr Vater oder Ihre Mutter einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall vor dem 60. Lebensjahr erlitten?

☐ Ja

☐ Nein

8. Hat eines oder mehrere Ihrer Geschwister einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall vor dem 60. Lebensjahr erlitten?

O Ja

O Nein

9. Beträgt Ihre Urinausscheidung

O > 2000 ml/ Tag

O 1000 – 2000 ml/ Tag

O 500 – 1000 ml/ Tag

O < 500 ml/ Tag

10. Wie groß sind Sie?

11. Beschreiben Sie bitte ein typisches Frühstück, Mittagessen und Abendessen an einem Nicht-Dialysetag.

Frühstück:

Zwischenmahlzeit:

Mittagessen:

Zwischenmahlzeit:

Abendessen:

Getränke pro Tag: